

Aus dem Institut für Physiologie und Pathophysiologie
– Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Dominik Oliver –
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Aufklärung des molekularen krankheitsauslösenden
Mechanismus der progressiven kardialen Reizleitungsstörung
durch die Mutation G88R im Tandem-Poren-Kanal TASK-4**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin dem Fachbereich der Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Julia Leonhardt aus Cuxhaven

Marburg, 2021

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 26.05.2021

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekanin: Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner

Referent: Prof. Dr. Niels Decher

Korreferent: Prof. Dr. Wolfram Grimm

Für meine Mutter und meine guten Freunde.

INHALTSVERZEICHNIS

1. ABKÜRZUNGS-, ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNISSE	1
1.1. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	1
1.2. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	2
2. EINLEITUNG	4
2.1. ALLGEMEINE CHARAKTERISIERUNG UND SYSTEMATISCHE EINTEILUNG VON KALIUMKANÄLEN	4
2.2. TANDEMPOREN-KALIUMKANÄLE (K ₂ P-KANÄLE)	5
2.2.1. DIE PH-SENSITIVE K ₂ P-KANALGRUPPE TASK	12
2.2.2. DER K ₂ P-KANAL TASK-4	14
2.2.3. IDENTIFIKATION DER TASK-4 ^{G88R} MUTATION IN EINEM PATIENTEN MIT PROGRESSIVER KARDIALER REIZLEITUNGSSTÖRUNG	17
2.3. ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	21
3. MATERIAL UND METHODEN	22
3.1. ELEKTROPHYSIOLOGIE	22
3.1.1. VERSUCHSTIERE	22
3.1.2. ISOLATION DER OOZYTEN	22
3.1.3. INJEKTION DER RNA IN XENOPUS LAEVIS OOZYTEN	23
3.1.4. MESSLÖSUNGEN	24
3.1.5. DIE ZWEI-ELEKTRODEN SPANNUNGSKLEMMEN (TEVC)	24
3.1.6. EINZELKANALMESSUNGEN MIT DER PATCH-CLAMP-METHODE	25
3.1.7. DATENANALYSE UND STATISTISCHE AUSWERTUNG	28
3.2. MOLEKULARBIOLOGIE	29
3.2.1. TRANSFORMATION VON PLASMID-DNA IN BAKTERIEN	29
3.2.2. PLASMIDISOLIERUNG AUS BAKTERIEN	30
3.2.3. POSITIONSGERICHTETE MUTAGENESE	30
3.2.4. LINEARISIERUNG UND AUFRÄUHNIGUNG VON PLASMID-DNA	31
3.2.5. IN VITRO TRANSKRIPTION UND FÄLLUNG DER CRNA DURCH LICL PRÄZIPITATION	31
3.2.6. QUANTIFIZIERUNG VON RNA UND DNA	32

4. ERGEBNISSE	33
4.1. UNTERSUCHUNG DES DER STROMERHÖHUNG DER TASK-4 ^{G88R} MUTATION ZU GRUNDE LIEGENDEN MECHANISMUS	33
4.1.1. DIE HYDROPHOBIZITÄT DES AMINOSÄURERESTES AN POSITION 88 BEEINFLUSST DIE STROMAMPLITUDE DES TASK-4 KANALS	33
4.1.2. EINFLUSS DES AMINOSÄURERESTES AN POSITION 88 AUF DIE PH-ABHÄNGIGKEIT	37
4.1.3. VERGLEICH DER EINZELKANALPARAMETER VON TASK-4 ^{WT} UND TASK-4 ^{G88R}	42
5. DISKUSSION	45
5.1. PERSPEKTIVE	51
6. ZUSAMMENFASSUNG	52
6.1. ZUSAMMENFASSUNG	52
6.2. SUMMARY	54
7. LITERATURVERZEICHNIS	56
8. ANHANG	65
8.1. PUBLIKATIONEN	65
8.2. VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER/-INNEN	66
8.3. DANKSAGUNG	67

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 2.1 Dendrogramm der K_{2P} -Kanalfamilie
- Abb. 2.2 Schematische Darstellung einer K_{2P} -Untereinheit
- Abb. 2.3 Dreidimensionale Darstellung eines K_{2P} -Kanals
- Abb. 2.4 Grafische Darstellung eines K_{2P} -Tetramers als integrales Membranprotein
- Abb. 2.5 Schematische Darstellung des Spannungs-Sensors in K_{2P} -Kanälen
- Abb. 2.6 Phylogenetischer Stammbaum der pH-abhängigen K_{2P} -Kanäle
- Abb. 2.7 Werte der halbmaximalen Inhibition (pH_{50}) bei pH-abhängigen K_{2P} -Kanälen
- Abb. 2.8 Darstellung der extrazellulären pH-Sensitivität von TASK-4 Strömen und des Ruhemembranpotentials
- Abb. 2.9 Lokalisation des G88 Residuums in einem TASK-4 Homologiemodell basierend auf TWIK-1 (A) sowie in einer schematischen Darstellung einer K_{2P} -Untereinheit (B)
- Abb. 3.1 Schematische Darstellung: Prozess der Expression von exogenen Proteinen in *Xenopus* Oozyten
- Abb. 3.2 Funktionsprinzip und Aufbau eines TEVC-Messplatzes
- Abb. 3.3 Darstellung eines Patch-Clamp-Messplatzes
- Abb. 3.4 Illustration der Generierung eines Membran-Patches
- Abb. 4.1 Relativierte Stromamplituden nach Einführung 20 verschiedener Aminosäuren an Position 88 im TASK-4 Kanal
- Abb. 4.2 Korrelationsanalyse
- Abb. 4.3 Stromamplituden und pH-Abhängigkeit verschiedener TASK-4 Mutanten
- Abb. 4.4 Darstellung der Stromamplituden und deren pH-Abhängigkeit bei Mutation der Position 242 in TASK-4-Kanälen
- Abb. 4.5 Vergleich der Stromamplituden und deren pH-Abhängigkeit bei Mutation der Position 242 und G88R in TASK-4-Kanälen
- Abb. 4.6 Repräsentative Einzelkanal-Ströme von TASK-4^{WT} und TASK-4^{G88R}
- Abb. 4.7 Die Strom-Spannungsbeziehung von TASK-4^{WT} und TASK-4^{G88R} auf Einzelkanalebene

TABELLENVERZEICHNIS

- Tab. 1 Hydrophobizitäts-Skalen nach Janin (1979) und Eisenberg (1984)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AV-Knoten	Atrio-ventrikulärer Knoten im Herzen
CCB	Cardiac Conduction Block (kardialer Reizleitungsblock)
CCD	Cardiac Conduction Disorder (kardiale Reizleitungsstörung)
cDNA	complementary DNA
cRNA	complementary RNA
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser (double distilled)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendinitrilotetraacetat
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EKG	Elektrokardiogramm
EIP	Extracellular Ion Pathway (extrazellulärer Ionen-Passageweg)
GHK	Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HL-1	kardiale Muskelzell-Linie
ICD	implantierbarer kardioverter Defibrillator
<i>I-V</i>	Strom-Spannungs-Beziehung
KH1, KH2	Kappen-Helix 1 und 2
K _{2p} -Kanal	Tandemporen-Kaliumkanal (two-pore-domain)
K _v -Kanal	spannungsgesteuerter Kaliumkanal (voltage-gated)
K _{ir} -Kanal	einwärts-gerichteter Kaliumkanal (inward-rectifier)
LB-Medium	Lysogeny Broth-Medium
M1-M4	Transmembranhelices
mRNA	messenger RNA (Ribonukleinsäure)
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
Na _v 1.5	spannungsabhängiger Natriumkanal
NTP	Nukleotid-Triphosphat
PCCD	Progressive Cardiac Conduction Disorder (progressive kardiale Reizleitungsstörung)
PCR	polymerase-chain-reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat

PPT	pathogen prediction tool
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
QRS-Komplex	repräsentiert im EKG die Erregungsausbreitung im Ventrikelyokard des Herzens
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
S1-S4	Transmembranhelices
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler des Mittelwerts)
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TEA	Tetraethylammonium
TEVC	Two-electrode voltage-clamp (Zwei-Elektroden Spannungsklemme)
TM	Transmembransegment
TALK	TWIK-related alkaline-sensitive K ⁺ channel
TASK	TWIK-related acid-sensitive K ⁺ channel
THIK	Tandem pore domain halotane-inhibited K ⁺ channel
TRAAK	TWIK-related acid-arachidonic activated K ⁺ channel
TREK	TWIK-related K ⁺ channel
TRESK	TWIK-related spinal cord K ⁺ channel
TWIK-1	Two P-domain in a weakly inward rectifying K ⁺ channel
P1, P2	Porendomäne
SF	Selektivitätsfilter
UV	Ultraviolett
V_{rest}	Ruhemembranpotential

Nicht aufgeführt sind:

- Allgemein gebräuchliche Abkürzungen der deutschen Sprache nach dem Duden.
- Die Formelzeichen des internationalen Einheitensystems (SI, Le Système international d'unités) und deren abgeleitete Einheiten.
- Die Abkürzungen für chemische Elemente entsprechen den Angaben des Periodensystems der Elemente nach der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC).

2. EINLEITUNG

2.1. Allgemeine Charakterisierung und systematische Einteilung von Kaliumkanälen

Kaliumkanäle sind sowohl in tierischen als auch pflanzlichen Zellmembranen allgegenwärtig. Der Transport von Kaliumionen spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Zellvolumens, des Zellwachstums und der Erregbarkeit von Membranen (O'Connell *et al.*, 2002). Darüber hinaus beeinflussen Kaliumkanäle im menschlichen Körper zahlreiche weitere überlebenswichtige Vorgänge. Dazu zählt die Sekretion von Neurotransmittern und Hormonen, die neuronale Informationsverarbeitung, die Herztätigkeit und die Muskelkontraktion.

Aufgrund ihrer jeweiligen Eigenschaften und ihrem molekularen Aufbau, werden Kaliumkanäle in verschiedene Gruppen unterteilt. Die größte Gruppe bilden die spannungsabhängigen K^+ -Kanäle (voltage-gated = K_v). Sie bilden ein Tetramer, in welchem eine Untereinheit jeweils aus sechs Transmembransegmenten und einer Porendomäne aufgebaut ist (1P/6TM). Der Selektivitätsfilter für Kaliumionen ist direkter Bestandteil der Porendomäne. Bei Depolarisation öffnen K_v -Kanäle und tragen somit zu der Repolarisation der Zelle während eines Aktionspotentials bei. Die zweite Gruppe besteht aus den einwärts-gleichrichtenden K^+ -Kanälen (inward rectifier = K_{ir}). Jede Untereinheit der K_{ir} -Kanäle besteht aus einer Porendomäne und zwei Transmembransegmenten (1P/2TM). Auch K_{ir} -Kanäle bilden ein Tetramer. Im physiologischen Spannungsbereich generieren sie Auswärtsströme, die sich bei zunehmender Depolarisation verringern, da die Kanäle durch geladene Moleküle, wie Magnesium-Ionen oder Polyamine (Spermin, Spermidin, Putreskin und Cadaverin), von der zytosolischen Seite aus blockiert werden. Sie leisten einen wichtigen Beitrag zur Stabilisierung des Ruhemembranpotentials, welches existenziell für die Integrität der Zelle ist, und modulieren dadurch die zelluläre Erregbarkeit. Dies gilt auch für die dritte Hauptgruppe, den Tandemporen- K^+ -Kanälen (two-pore-domain = K_{2p}), sie bilden den Fokus dieser Dissertation. Die charakteristische Architektur eines Dimers aus zwei Poren-Domänen und vier Transmembransegmenten (2P/4TM) je Untereinheit gab den K_{2p} -Kanälen ihren Namen (Lesage *et al.*, 2000; O'Connell *et al.*, 2002).

2.2. Tandemporen-Kaliumkanäle (K_{2P}-Kanäle)

Die Existenz von Leck-Kanälen wurde bereits 1952 durch Hodgkin & Huxley beschrieben, ab diesem Zeitpunkt blieben sie aber für die folgenden 40 Jahre eher ein biophysikalisches Kuriosum (Goldstein *et al.*, 2005). Erste molekulare Charakterisierungen erfolgten anhand des K_{2P}-Kanals TOK-1, der erfolgreich aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* kloniert werden konnte sowie homologer Strukturen aus dem Genom des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* (Ketchum *et al.*, 1995). Kurz darauf gelang die Klonierung des K_{2P}-Kanals ORK-1 aus neuromuskulärem Gewebe der Taufliege *Drosophila melanogaster* (Goldstein *et al.*, 1996). Der erste in Säugetieren identifizierte K_{2P}-Kanal war TWIK-1 (Tandem of P-Domains in a Weakly Inward rectifying K⁺ channel) (Lesage *et al.*, 1996a). TWIK-1 zeigte den für K_{2P}-Kanäle typischen Aufbau aus zwei Porendomänen und vier Transmembransegmenten je Untereinheit und unterschied sich dahingehend von den bis dahin bekannten Kaliumkanälen mit nur einer Poren-Domäne je Untereinheit. Das Forschungsgebiet der K_{2P}-Kanäle ist noch relativ jung, daher werden die Kanäle entweder von deren Entdeckern oder dem Human Genome Nomenclature Committee (HGNC) benannt, was in der Literatur teilweise zu verwirrenden Doppelbezeichnungen führt (O’Connell *et al.*, 2002).

Insgesamt gibt es 15 Mitglieder der K_{2P}-Kanalfamilie (Abb. 2.1), welche basierend auf dem Konservierungsgrad ihrer Aminosäuresequenz sowie ihren funktionellen Eigenschaften in sechs Untergruppen eingeteilt werden. Hierbei steht die Kanalbezeichnung TREK für TWIK-related K⁺ channel, TRAAK für TWIK-related acid-arachidonic activated K⁺ channel, TASK für TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel, TALK für TWIK-related alkaline-sensitive K⁺ channel, THIK für Tandem pore domain halotane-inhibited K⁺ channel und TRESK für TWIK-related spinal cord K⁺ channel (Felicangeli *et al.*, 2015; Brohawn *et al.*, 2012).

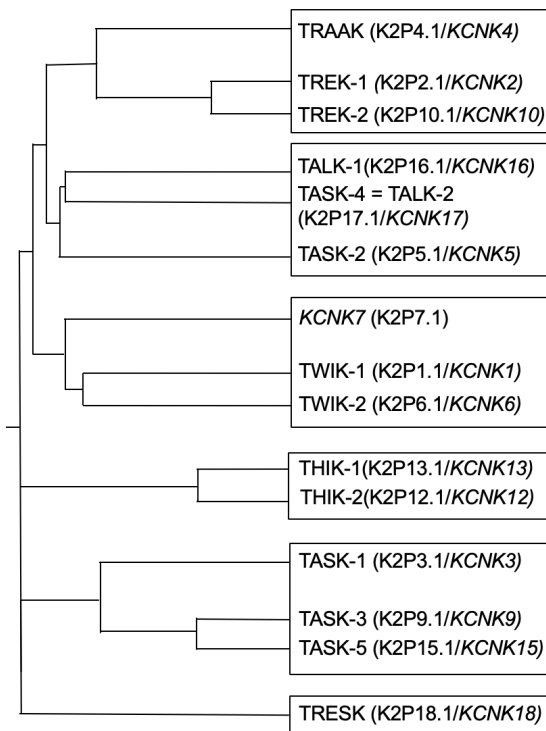


Abb. 2.1: Dendrogramm der K₂P-Kanalfamilie

Stammbaum der 15 Mitglieder der K₂P Kanalfamilie mit ihren konventionellen und systematischen Bezeichnungen sowie ihren Genbezeichnungen (modifiziert nach Feliciangeli *et al.*, 2015).

Jede Untereinheit eines K₂P-Kanals setzt sich, wie bereits erwähnt, aus zwei Poren-Domänen (P1 und P2) und vier Transmembran-Helices (M1-M4) zusammen; der N- und C-Terminus liegen intrazellulär. Charakteristisch ist darüber hinaus die ausladende, extrazelluläre „M1P1-Schleife“ (Abb. 2.2) (Lesage *et al.*, 1996; Lesage *et al.*, 2000). Diese M1P1-Schleife liegt in Form einer amphipathischen α -Helix vor, die eine sogenannte Kappe bildet. Die helikale Kappe, welche oberhalb der Kanalpore lokalisiert ist, ist eine weitere strukturelle Besonderheit von K₂P-Kanälen (Abb. 2.2). Einige K₂P-Kanäle besitzen an der Spitze dieser Kappe einen Zystein-Rest, der das Dimer über Disulfid-Brücken stabilisiert (Lesage *et al.*, 1996). Der Zystein-Rest ist jedoch nicht essentiell für die funktionelle Expression von K₂P-Kanälen, so dass man annimmt, dass hydrophobe Aminosäure-Reste an der inneren Kontaktfläche der Kappen-Domäne interagieren und die Struktur dadurch stabilisieren (Goldstein *et al.*, 2016). Diese Architektur lässt einen schmalen, gegabelten Passage-Tunnel für Ionen entstehen, den extrazellulären Ionen-Passageweg (extracellular ion pathway – EIP, Abb. 2.3) (Miller *et al.*, 2012; Brohawn *et al.*, 2012). Der EIP ermöglicht einen bilateralen Zutritt von K⁺-Ionen durch sogenannte Seitenportale zu den K⁺-Bindungsstellen im Selektivitätsfilter. Die Regulation des EIP durch die Seitenportale kann eine

wichtige Rolle in Bezug auf die Kanalfunktion einnehmen, wie für den pH-sensitiven K_{2P} -Kanal TASK-3 gezeigt werden konnte (González *et al.*, 2013).

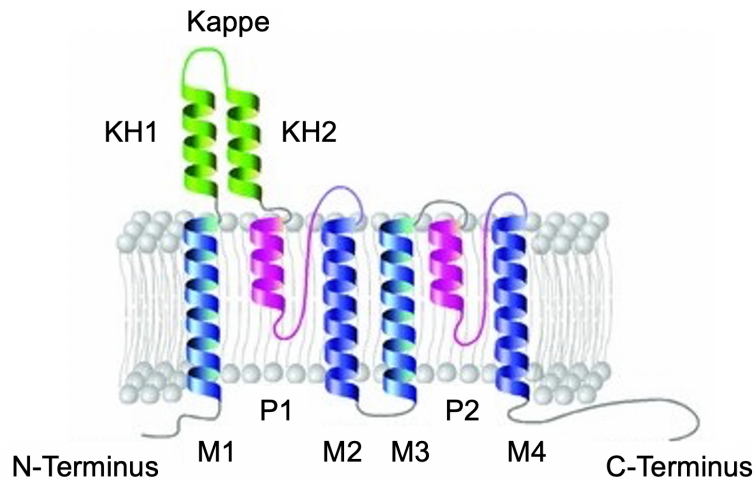


Abb. 2.2: Schematische Darstellung einer K_{2P} -Untereinheit

M1-M4 bezeichnen die Transmembrandomänen (blau), P1 und P2 die Porendomänen (rot). Die Kappenstruktur liegt extrazellulär, die Kappen-Helices sind mit KH1 und KH2 bezeichnet (grün). Der N- sowie der C-Terminus befinden sich intrazellulär (modifiziert nach Feliciangeli *et al.*, 2015).

Die Poren-Region besteht aus einer Sequenz von insgesamt 30 Aminosäuren und enthält neben der Poren-Helix den Selektivitätsfilter für Kaliumionen mit der Signatursequenz T-X-G-Y-G, in der P2-Domäne auch häufig T-X-G-F-G (Doyle *et al.*, 1998; Brohawn *et al.*, 2012). Zwei Untereinheiten assemblieren zum funktionellen K_{2P} -Kanal. Dieses Dimer kann nicht nur in Form eines Homomers sondern für einige K_{2P} -Kanäle auch als Heteromer ausgebildet werden. Eine Bildung von Heteromeren ist zum Beispiel für TASK-1/TASK-3, THIK-2/THIK-1, TREK-1/TREK-2 und TWIK-1/TREK1 Untereinheiten bekannt (Czirják *et al.*, 2002; Berg *et al.*, 2004; Blin *et al.*, 2014; Lengyel *et al.*, 2016; Hwang *et al.*, 2014).

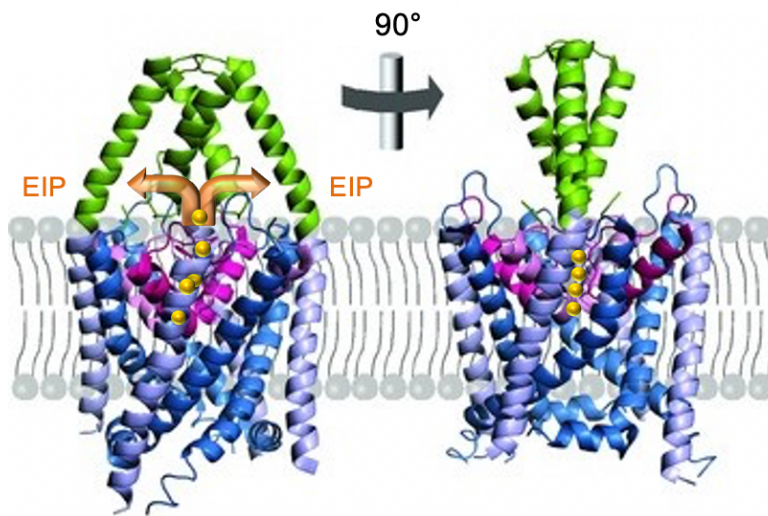


Abb. 2.3: Dreidimensionale Darstellung eines K_{2P}-Kanals

Generelle Eigenschaften von K_{2P}-Kanälen illustriert anhand der Kristallstruktur von TWIK-1 (Miller & Long, 2012; Identitätscode 3UKM der Proteindatenbank). Die verschiedenen Domänen wurden mit demselben Farbcode wie in Abb. 2.2 dargestellt. Kaliumionen sind in Form von gelben Kugeln abgebildet, der extrazelluläre Ionen-Passageweg (EIP) wurde mit orangenen Pfeilen markiert (modifiziert nach Feliciangeli *et al.*, 2015).

Bei K_v-Kanälen wird die Pore aus vier identischen Untereinheiten gebildet, die in einer vierfach-gefalteten Symmetrie vorliegen. Kristallisationen und Röntgenstrukturanalysen von TWIK-1, TRAAK, TREK-2 und TASK-1 konnten zeigen, dass die Poren-Domänen bei K_{2P}-Kanälen eine zwei-gefaltete Symmetrie aufweisen (Miller & Long, 2012; Brohawn *et al.*, 2012; Dong *et al.*, 2015; Rödström *et al.*, 2020). Dies ist in ihrem Aufbau aus zwei Untereinheiten mit je zwei Poren-Domänen begründet. Jede der Beiden beinhaltet zwei unterschiedliche Porenschleifen (Abb. 2.4). Diese Abweichung in der Symmetrie der Kanalpore ist von großer Bedeutung für das Verständnis der Kanalfunktion, denn bei Kaliumkanälen der K_v-Familie ist die Regulation des Passageweges (Gating) an der intrazellulären Oberfläche häufig mit einer Konformationsänderung der vier-gefalteten Symmetrie verbunden, die darüber bestimmt, ob der Kanal geschlossen oder geöffnet ist. Geht der Kanal in den offenen Zustand über, so kommt es zu einer Aufweitung der Kanalpore (Jiang *et al.*, 2002).

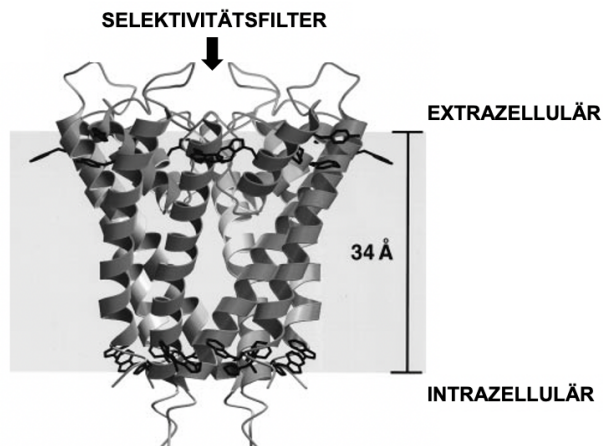


Abb. 2.4: Grafische Darstellung eines K_{2P} -Tetramers als integrales Membranprotein

Aromatische Aminosäuren auf der Membran zugewandten Oberfläche sind in schwarz dargestellt. Diese sind wie eine Manschette angeordnet und entstehen durch die Interaktion von Valin- und Tyrosin-Seitenketten aus der V-G-Y-G-Sequenz mit Tryptophan-Resten aus der Porenhelix. Sie sind ein wichtiges Merkmal des Selektivitätsfilters (modifiziert nach Doyle *et al.*, 1998).

Eine weitere Besonderheit von K_{2P} -Kanälen ist das Phänomen der „domain-swapped chain connectivity“, welches erstmals bei der Kristallisation von TRAAK-Proteinen auffiel (Brohawn *et al.*, 2013). In der Kappenstruktur kommt es dabei zu einem Domänentausch der äußeren Helices der beiden identischen Untereinheiten (KH1 und KH2, Abb. 2.2). Die äußere Helix auf einer Untereinheit tauscht den Platz mit ihrer identischen Kopie auf der anderen Untereinheit. Hierbei muss sich die äußere Helix um 180° im Uhrzeigersinn drehen, damit der neue Standort erreicht werden kann. Durch diese Konformationsänderung wird eine Seitenöffnung zur Membrandoppelschicht verschlossen. Infolge dessen kommt es zu einer strukturellen Änderung am K^+ -Selektivitätsfilter, der Auswirkungen auf die Kanaleigenschaften, wie zum Beispiel die Mechanosensitivität bei TRAAK, und das Gating haben könnte (Brohawn *et al.*, 2013). Die „domain-swapped chain connectivity“ wurde auch bei Kristallisationen von TREK-1 (PDB ID: 4TWK) und TREK-2 (Dong *et al.*, 2015) beobachtet.

In neuesten, röntgen-kristallographischen Untersuchungen eines Modells von TASK-1 konnte zudem, erstmals bei K_{2P} -Kanälen, ein Gate unterhalb des Selektivitätsfilters identifiziert werden, das sogenannte „X-Gate“ (Rödström *et al.*, 2020). Dieses entsteht durch eine Interaktion der zwei gekreuzten C-terminalen M4-Transmembransegmente am Eingang des Vestibulums und besteht aus sechs Aminosäureresten ($^{243}\text{VLR}^{\text{FMT}248}$). Mutationen innerhalb des „X-Gates“ und den umgebenen Strukturen beeinflussten sowohl die Kanalöffnungswahrscheinlichkeit als auch die Bindungsaffinität für Anästhetika. Es konnte gezeigt werden, dass TASK-1 durch einige volatile

Anästhetika deshalb sehr effektiv aktiviert wird. Durch das X-Gate unterhalb des Selektivitätsfilters im Vestibulum können Medikamente gebunden werden.

Unter physiologischen Bedingungen generieren K_{2P} -Kanäle auswärts-rectifizierende Ströme welche der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung (GHK) für eine lecke, K^+ -selektive Membranpore entsprechen (Goldstein *et al.*, 2001). Aufgrund dieses, für sie typischen, Verhaltens werden K_{2P} -Kanäle auch als „offene Rectifizierer“ bezeichnet, da die Stromrichtungen und das Gleichgewichtspotential nahe den prädiktiven Werten aus den Gleichungen für einen konstanten Feldstrom per freier Elektrodifusion durch einen offenen, selektiven Kaliumkanal liegen (Goldman 1943, Hodgkin & Katz 1949). Der Auswärtsstrom wäre demnach lediglich durch die Asymmetrie der K^+ -Konzentration auf den beiden Seiten der Membran begründet. Sein Auftreten setzt eine niedrige extrazelluläre und eine hohe intrazelluläre K^+ -Konzentration voraus, wie es bei Säugetierzellen der Fall ist. Ist die K^+ -Konzentration beidseits der Membran identisch, so ist die Strom-Spannungs-Beziehung ($I-V$) linear (Goldstein *et al.*, 2001). Jedoch kann es innerhalb der Kanalfamilie durchaus zu Variationen im Rectifizierungsverhalten kommen (Felicciangeli *et al.*, 2015). Während die Strom-Spannungs-Beziehung von TASK-1 exakt der GHK-Gleichung entsprach (Duprat *et al.*, 1997), zeigte TREK-1 in der $I-V$ Kurve eine dezente Auswärtsrectifizierung (Bockenhauer *et al.*, 2001; Fink *et al.*, 1996), TWIK-1, TWIK-2, TASK-3 und THIK-1 dagegen eine leichte Einwärtsrectifizierung (Lesage *et al.*, 1996; Patel *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2000; Rajan *et al.*, 2001). Neuere Untersuchungen der biophysikalischen Eigenschaften der K_{2P} -Kanalgruppe (TRAAK, TREK-1, TREK-2, TRESK, TALK-2 (TASK-4), TASK-1, TASK-2, TASK-3) zeigten als Resultat eines zeitlichen und spannungsabhängigen Aktivierungsprozesses verstärkte Auswärtsströme (Schewe *et al.*, 2016). Während der Repolarisation traten bei den Kanälen TRAAK, TREK-1, TREK-2, TALK-2 (TASK-4) und TASK-3 parallel zu den Amplituden der Auswärtsströme starke Einwärtsströme (tail-currents) auf, die auf eine erhebliche Steigerung der Offenwahrscheinlichkeit (P_o) hinwiesen. Der einzige Kanal, der sich tatsächlich wie ein klassischer Kalium-selektiver Leck-Kanal ohne K^+ -Flux Gating verhielt, war TWIK-1. Der Kanal zeigte im Gegensatz zu den anderen K_{2P} -Kanälen weder eine zeitliche noch eine spannungsabhängige Aktivierung. Daraus konnte man schließen, dass K_{2P} -Kanäle spannungsabhängig sind und ihre Regulation vermutlich auf einem Gating-Mechanismus beruht, der durch den Ionenstrom selbst entsteht und direkt über den elektrochemischen K^+ -Gradienten angetrieben wird („Ion-Flux-Gating“) (Schewe *et al.*, 2016). Das differente Verhalten von TWIK-1 könnte in der speziellen Architektur und den funktionellen Eigenschaften des Selektivitätsfilters begründet sein (Chen *et al.*, 2014). Führte man in TRAAK, TASK-1, TASK-2 und TASK-3 Mutationen von zwei Threonin-Resten innerhalb der Filtersequenz T-I-G-F-G durch, in P1 sowie

in P2, war das spannungsabhängige Gating aufgehoben. Die Hydroxylgruppe dieser Threonin-Reste war die einzige Seitenkette innerhalb der Filtersequenz, die direkt mit K^+ interagierte. Der Selektivitätsfilter verfügt über vier K^+ -Bindungsstellen (S1-S4). Eine Mutation der Threonin-Reste in P1 führte an der S4-Bindungsstelle, welche direkt am Selektivitätsfilter liegt, zu einer reduzierten Bindung und herabgesetzten Permeabilitäts-Rate von K^+ -Ionen. Ähnliches wurde bereits in vorhergehenden Studien von Zhou *et al* (2004) bei bakteriellen KcsA-Kanälen beobachtet. Weitergehend untersuchte man den Einfluss auf die Spannungsaktivierung durch Permeation verschiedenener intrazellulärer Ionen in TRAAK, TREK-1, TREK-2, TALK-2 (TASK-4), TASK-3, and TRESK. Bei TRAAK kam es beim Durchtritt von Rubidium-Ionen (Rb^+) zu verstärkten Auswärtsströmen, im geringeren Maße auch bei Caesium-Ionen (Cs^+). Detaillierte kristallographische Untersuchungen konnten zudem zeigen, dass diese Effekte durch die Eigenschaften der verschiedenen Ionen in Bezug auf die Spannungsaktivierung mit einer veränderten Bindung der Ionen im Selektivitätsfilter zusammenhingen. Die Ergebnisse implizieren, dass sowohl die streng konservierte Aminosäuresequenz als auch die Bindungsfähigkeit von K^+ -Ionen innerhalb des Selektivitätsfilters eine wichtige Rolle für den spannungsabhängigen Gating-Mechanismus spielen (Schewe *et al.*, 2016).

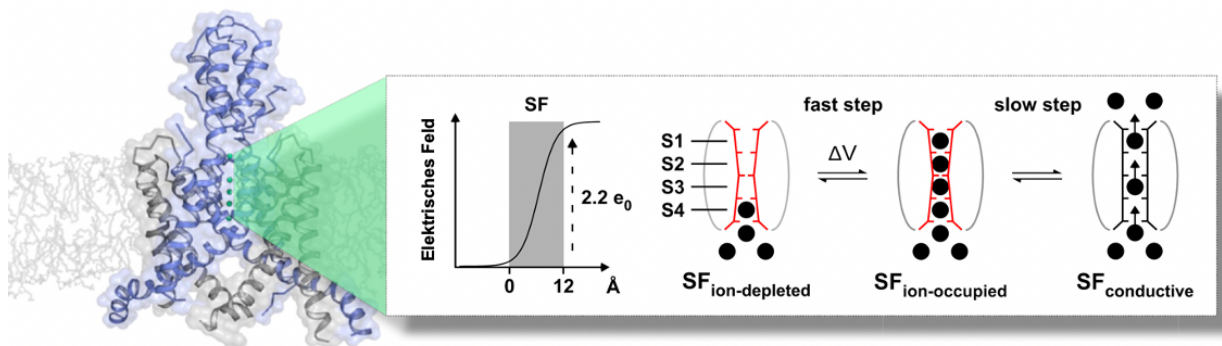


Abb. 2.5: Schematische Darstellung des Spannungs-Sensors in K_{2P} -Kanälen

Das Modell zeigt die Struktur des K_{2P} -Kanals TRAAK. Die Ladungsveränderung im elektrischen Feld des Selektivitätsfilters (SF) induziert den Gating-Mechanismus. Schematisch ist der inaktive SF während der Repolarisation dargestellt ($SF_{ion-depleted}$). Während der Depolarisation werden Ionen nun in das elektrische Feld gezwungen ($SF_{ion-occupied}$). Dieser Zustand ist instabil und geht in eine permeable Konformation über ($SF_{conductive}$) (modifiziert nach Schewe *et al.*, 2016).

Der spannungsabhängige Ion-Flux-Gating-Mechanismus wird demnach bei Durchtritt von K^+ -Ionen durch eine Ladungsänderung im elektrischen Feld des Selektivitätsfilters induziert (Abb. 2.5) (Schewe *et al.*, 2016).

K₂P-Kanäle sind durch verschiedene Stimuli regulierbar (Felicciangeli *et al.*, 2015). So werden beispielsweise die Mitglieder der mechanosensitiven TREK/TRAAK-Subfamilie durch Membrandehnung, Temperatur und Arachidonsäure aktiviert oder THIK durch Halothan inhibiert (Lesage *et al.*, 1996; Lesage *et al.*, 2000). TRESK wird durch eine Interaktion mit der Kalzium/Kalmodulin-abhängigen Phosphatase Kalzineurin reguliert, welche die intrazelluläre Kalziumsensitivität vermittelt (Czirják *et al.*, 2004). K₂P-Kanäle können auch über G-Proteingekoppelte Mechanismen moduliert werden. Verschiedene Second Messenger vermitteln hier unterschiedliche Effekte. Dazu zählen unter anderem die Proteinkinase A, C, G und PIP₂ (Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat) (Fink *et al.*, 1996; Lesage *et al.*, 2000; Lopes *et al.*, 2005; Niemeyer *et al.*, 2017). Es ist auch ein G-Protein-vermittelter Mechanismus durch Interaktion der β- und γ-Untereinheit des G-Proteins mit dem zytoplasmatischen N-Terminus von K₂P-Kanälen bekannt (Añazco *et al.*, 2013; Woo *et al.*, 2012). Die Kanäle stellen zudem wichtige Zielstrukturen für pharmakologische Substanzen wie Anästhetika oder neuroprotektive und antidepressive Agenzien dar (Heurteaux *et al.*, 2004; Borsotto *et al.*, 2015; Linden *et al.*, 2006).

Zentrales Thema dieser Doktorarbeit ist der pH-sensitive K₂P-Kanal TASK-4, daher soll die TASK-Gruppe im nachfolgenden Kapitel detaillierter beschrieben werden.

2.2.1. Die pH-sensitive K₂P-Kanalgruppe TASK

Die pH-abhängigen K₂P-Kanäle können grundsätzlich in zwei verschiedene Untergruppen eingeteilt werden, TASK/TALK und TWIK-1 (Abb. 2.6). TWIK-1 wurde 1996 (Lesage *et al.*, 1996a), TWIK-2 1999 (Chavez *et al.*, 1999) erstmals charakterisiert. TASK wurde 1997 anhand von TASK-1 beschrieben (Duprat *et al.*, 1997), welcher nahe mit dem nachfolgend entdeckten Kanal TASK-3 verwandt ist (Kim *et al.*, 2000). Weitere Mitglieder der TASK-Familie sind die Proteine TASK-2 (Reyes *et al.*, 1998) und der strukturell nahe Verwandte TASK-4 (TALK-2). Kurz nachdem TASK-4 durch Decher *et al.* (2001) kloniert werden konnte, wurde der Kanal ebenfalls durch Girard *et al.* (2001) unter der Bezeichnung TALK-2 beschrieben. TASK-5 kann nach aktuellem Wissensstand keine funktionellen Kanäle ausbilden (Ashmole *et al.*, 2001; Karschin *et al.*, 2001). TALK-Kanäle kommen in den verschiedensten Organgeweben vor. Eine besonders starke Expression findet sich im Pankreas und der Plazenta (Decher *et al.*, 2001).

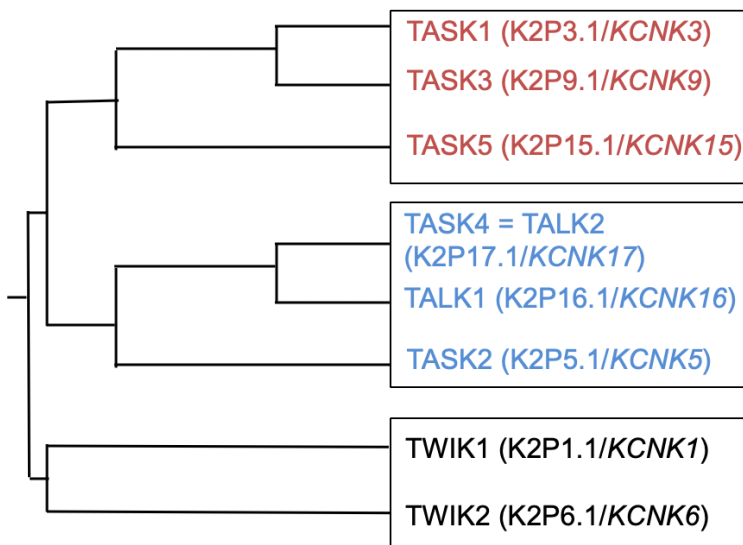


Abb. 2.6: Phylogenetischer Stammbaum der pH-abhängigen K₂P-Kanäle

pH-abhängige K₂P-Kanäle und ihre Sensitivität gegenüber extrazellulären Protonen einschließlich der Subgruppen der TASK- TALK- sowie TWIK-Kanäle (modifiziert nach Decher *et al.*, 2014).

Den TASK-Kanälen ist gemeinsam, dass sie zwar hoch sensitiv in Bezug auf extrazelluläre pH-Wertänderungen sind, zytosolische Variationen des pH-Wertes jedoch keinen Effekt erzielen (Duprat *et al.*, 1997). TASK-2, TASK-4 und TALK-1 haben wiederum gemeinsam, dass deren Ströme durch deutlich alkalischere pH-Werte halbmaximal inhibiert werden als dies bei den TASK-1- und TASK-3-Strömen der Fall ist. Der Wert der halbmaximalen Inhibition (pH₅₀) ist im Vergleich deutlich in den alkalischen Bereich verschoben (Abb. 2.7) (Decher *et al.*, 2014).



Abb. 2.7: Werte der halbmaximalen Inhibition (pH₅₀) bei pH-abhängigen K₂P-Kanälen

Dargestellt ist die Protonen-Sensitivität (pH₅₀-Werte) von TASK und TWIK in Klammern. pH₅₀-Werte im basischen Bereich sind in blau, jene im eher sauren Bereich in rot dargestellt (modifiziert nach Decher *et al.*, 2014).

Die Regulationsmechanismen der verschiedenen TASK/TALK-Kanalfunktionen sind weiterhin ein Schwerpunkt aktueller Forschungsprojekte.

So konnten Kim *et al.* (2000) zeigen, dass TASK-3 im Vergleich zu TASK-1 eine deutlich höhere Einzelkanal-Leitfähigkeit aufwies. Als pH-Sensor wurde bei TASK-3 ein Histidin an Position 98 identifiziert, nahe am Selektivitätsfilter lokalisiert. Die Seitenketten der beiden Histidin-Reste (ein H98 in jeder Untereinheit) säumen die Seitenportale, die den EIP für K⁺-Ionen bilden. Kommt es

nun zu einem extrazellulären Protonen-Anstieg, so verlagern sich die Seitenketten in den inneren Teil des Portals und verringern so dessen Durchmesser. Die K^+ -Konzentration in den Seitenportalen ist demnach ein wichtiger determinierender Faktor für die Kanalfunktion und -regulierung von TASK-3 (Kim *et al.*, 2000; González *et al.*, 2013). Bei TASK-2 hingegen führten Variationen des extrazellulären pH-Wertes zwar zu einer veränderten Öffnungswahrscheinlichkeit, nicht jedoch zu einer veränderten Einzelkanal-Leitfähigkeit (Reyes *et al.*, 1998; Kang *et al.*, 2004). Als pH-Sensor von TASK-2 wurde ein Arginin-Rest (R224) in einer hydrophoben Umgebung identifiziert, lokalisiert in einer Seitenkette der TM4-Helix und nahe der Kanalpore. Die hydrophobe Umgebung entsteht durch eine interaktive Wasserstoffbindung zwischen einem Isoleucin- und einem Asparagin-Rest an Position 224 der P1-Helix. Mutationen des Arginin-Restes an dieser Position führten zu einem Verlust der pH-Sensitivität. TASK-2^{R224} könnte somit als eine Art hydrophobe Tasche fungieren und säße nahe genug am Selektivitätsfilter, um den entsprechenden elektrostatischen Effekt erzielen zu können (Niemeyer *et al.*, 2007).

2.2.2. Der K_{2P} -Kanal TASK-4

Da die biophysikalischen Eigenschaften von TASK-4 einen Fokus dieser Arbeit bilden, sollen diese in diesem Kapitel etwas näher betrachtet werden. TASK-4 (TALK-2) wurde zusammen mit dem nahe verwandten Kanal TALK-1 im Rahmen von Untersuchungen von K_{2P} -Kanälen im Pankreas entdeckt. Im Herzen kam TASK-4 vorrangig in den Purkinjefasern vor. Eine geringere Expression fand sich im AV-Knoten > den Vorhöfen > dem Sinusknoten > und den Ventrikeln (Decher *et al.*, 2001; Friedrich *et al.*, 2014). Eine weitere Expression von TASK-4 fand sich im Gehirngewebe und besonders häufig in der Leber, der Lunge, der Plazenta, dem Pankreas, dem Dünndarm und der Aorta (Decher *et al.*, 2001). TASK-4 zeichnete sich durch eine Aktivierung (Disinhibition) des Ionenstroms in einem alkalischen pH-Wert Spektrum aus (Decher *et al.*, 2001, Girard *et al.*, 2001). Die pH-Sensitivität kann einen Effekt auf verschiedene Organsysteme haben und ist deshalb sehr relevant. So können Schwankungen des pH-Wertes beispielsweise die neuronale Aktivität und Entwicklung beeinflussen (Chesler *et al.*, 1992). TASK-4 könnte in Geweben von Bedeutung sein, in denen der pH-Wert physiologisch im alkalischen Bereich zwischen 7,5 und 8,5 schwankt. Diese Bedingungen sind beispielsweise im Pankreas zu finden. Dort könnte TASK-4 Auswärtsströme generieren, die in der Lage sind, das Ruhemembranpotential ausreichend zu beeinflussen (Decher *et al.*, 2001). Zudem gehen viele pathophysiologische Veränderungen mit Verschiebungen des pH-Wertes einher, denen alkalische pH-Wert-Veränderungen vorausgehen können.

(Duprat *et al.*, 1997). TASK-4 unterscheidet sich in Bezug auf die pH-Abhängigkeit von den anderen Mitgliedern der TASK-Subfamilie. Ein Histidin-Rest an Position 98 in der P1-Schleife, welcher bei TASK-1 und TASK-3 den Protonen-Block vermittelte, fand sich bei TASK-4 nicht (Kim *et al.*, 2000). Der TASK-4-Strom wurde im Vergleich zu anderen TASK-Kanälen bereits früher durch saure pH-Werte inhibiert. So war die Stromamplitude bei einem pH-Wert von 7,5 schon so gering, dass diese durch eine Azidifizierung des pH-Wertes nur noch um weitere 30% herabgesetzt werden konnte. Folglich waren TASK-4-Ströme bei diesem pH-Wert nicht mehr in der Lage das Ruhemembranpotential in Richtung des K^+ -Gleichgewichtspotentials zu verschieben. Bereits eine geringfügige Alkalisierung führte zu einer Aktivierung mit massiver Erhöhung der Stromamplitude, deutlich ausgeprägter als bei anderen TASK-Kanälen (Decher *et al.*, 2001). Eine pH-Wertveränderung des pH_o (extrazellulärer pH-Wert) von 7,5 nach 8,5 und 7,5 zu 9,0, führte zu einer Stromerhöhung um den Faktor 6 und 17 (Decher *et al.*, 2001). Die pH-abhängige Stromamplitude verlief sehr steil und eine Saturierung wurde innerhalb einer pH-Variationsbreite von 6,0 bis 10,5 nicht erreicht (Decher *et al.*, 2001). Der pK_i (pH-Wert, bei dem 50% Inhibition erreicht ist) musste dementsprechend in Richtung eines alkalischeren pH-Wertes verschoben sein. Der Anstieg des pH_o führte zu einer Stabilisierung des Ruhemembranpotentials (V_{rest}), da dieses durch die alkalische Aktivierung in Richtung des K^+ -Gleichgewichtspotentials (E_K) verschoben wurde (Abb. 2.8). Die molekulare Ursache dieser pH-Abhängigkeit blieb unklar (Decher *et al.*, 2001). Eine Charakterisierung von TASK-4 auf Einzelkanalebene zeigte eine Leitfähigkeit von 33 pS bei -60 mV, die mittlere Öffnungszeit betrug 0,8 ms. So erhöhte ein Anstieg des pH_o bei TASK-4 die Einzelkanal-Leitfähigkeit und die Öffnungswahrscheinlichkeit (Kang *et al.*, 2004). TASK-4-Kanäle konnten durch Barium stark und durch Chinin schwach inhibiert werden, gegenüber den anderen gängigen K^+ -Blockern waren sie unempfindlich (Decher *et al.*, 2001).

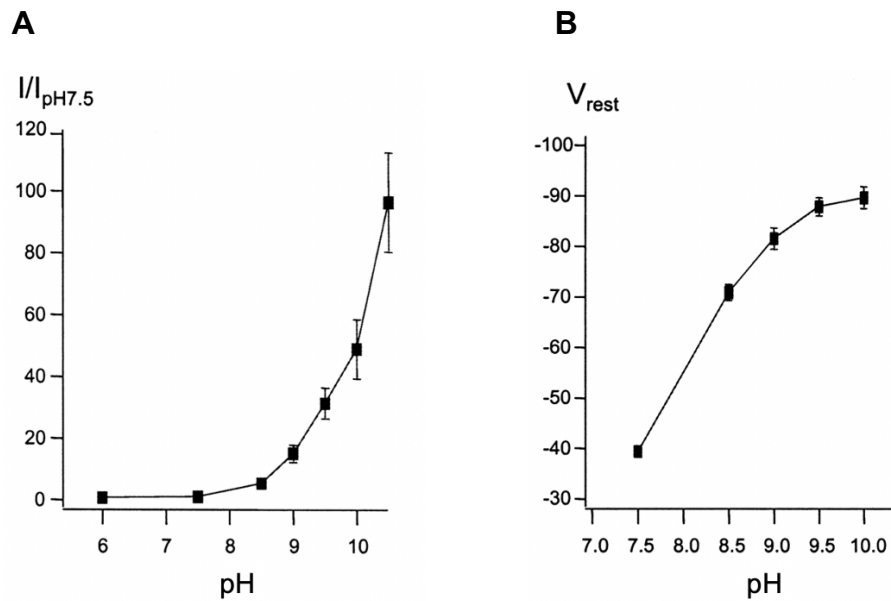


Abb. 2.8: Darstellung der extrazellulären pH-Sensitivität von TASK-4 und des Ruhemembranpotentials

- A Stromamplitude einer Oozyte nach Injektion von TASK-4 unter Variation des Spannungsprotokolls von -80 mV bis +40 mV und des pH-Wertes von 6,0-10,5. Die Amplituden wurden auf pH 7,5 normiert; Daten gemittelt auf \pm SEM, $n = 9-22$).
- B Abhängigkeit des Ruhemembranpotentials (V_{rest}) von TASK-4-Oozyten vom extrazellulären pH-Wert; Daten gemittelt auf \pm S.E.M, $n = 10-58$ (Decher *et al.*, 2001)

Der Mechanismus der pH-Sensitivität ähnelt vermutlich dem des TASK-2 und wird über einen pH-Sensor gesteuert (Niemeyer *et al.*, 2007). Äquivalent zu dem Arginin-Rest (R224) in TASK-2 befindet sich bei TASK-4 an entsprechender Position ein Lysin-Rest (K242). Niemeyer *et al.* konnten in ihren Untersuchungen zu dem pH-Sensor R224 bei TASK-2 zudem zeigen, dass dieser sich in direkter Nähe eines Asparagin-Restes an Position 87 (N87) des Selektivitätsfilters befand und über eine Interaktion mit einem Isoleuzin-Rest (I90) in einem hydrophoben Gerüst stabilisiert wurde. Diese Konstellation könnte zum einen die verschobene pH-Abhängigkeit des TASK-2 Kanales erklären, aber auf der anderen Seite auch einen verstärkten elektrostatischen Effekt in der Poren-Region erzeugen. Detaillierte Studien eines $K_v1.2$ -basierten Homologiemodells der Pore von TASK-4 ergaben, dass bei TASK-4 der Platz von I90 im TASK-2 Modell durch einen Phenylalanin-Rest an Position 108 übernommen wird. Da es sich bei Phenylalanin um eine aromatische Aminosäure handelt, die über π -Elektronen ein hydrophobes, elektrostatisches Umfeld schaffen kann, erschien es denkbar, dass bei TASK-4 eine beachtliche amino-aromatische Wechselwirkung den hohen pK_i begründet.

2.2.3. Identifikation der TASK-4^{G88R} Mutation in einem Patienten mit progressiver kardialer Reizleitungsstörung

Die progressive kardiale Reizleitungsstörung (PCCD), auch Lenegre oder Lev-Disease genannt, ist ein häufiges Krankheitsbild, welches vorrangig bei Patienten in der fünften Lebensdekade auftritt. Charakteristisch für die PCCD ist eine fortschreitende Herabsetzung der kardialen Reizleitungsgeschwindigkeit im His-Purkinje-System mit einem Links- oder Rechtsschenkelblock sowie einer Verbreiterung des QRS-Komplexes. Resultat kann ein kompletter AV-Block sein, welcher wiederum zu Synkopen oder plötzlichem Herztod führen kann. Der AV-Block repräsentiert eine der wichtigsten Indikationen für eine Herzschrittmacher-Implantation weltweit (Schott *et al.*, 1999; Friedrich *et al.*, 2014; Kruse *et al.*, 2009). Aus unbekannten Gründen wurde die PCCD zunächst als primär degenerative Erkrankung mit einer fortschreitenden, isolierten Sklerosierung des kardialen Reizleitungsgewebes betrachtet. Über hereditäre Ursachen der PCCD war wenig bekannt.

Im Jahre 1999 wurde erstmals die Mutation einer Spleißstelle im *SCN5A* Gen beschrieben, welche zum Überspringen des Exons 22 im Natriumkanal Na_v1.5 führte. Diese Genmutation wurde in einer französischen Familie in Verbindung mit dem Auftreten einer PCCD autosomal-dominant vererbt. Eine andere *SCN5A*-Mutation führte in einer dänischen Familie bereits zu einer nicht-progressiven CCD (Schott *et al.*, 1999). Später wurde eine weitere Mutation in der β 1-Untereinheit von Na_v1.5 (*SCN1B*) identifiziert, welche zu einem Funktionsverlust und einer damit verbundenen PCCD führte (Watanebe *et al.*, 2008). In dem Gen *LMNA*, welches für das Strukturprotein Lamin A/C als Bestandteil der nukleären Lamina kodiert, wurden fünf neuartige Mutationen identifiziert. Jede von ihnen war assoziiert mit hereditärer dilatativer Kardiomyopathie und hereditären Reizleitungsstörungen (Fatkin *et al.*, 1999). Einer Missense-Mutation in dem Gen *TRPM4* (transient receptor potential cation channel) konnte eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit dem Auftreten einer autosomal-dominanten Form der CCD in einer großen, südafrikanischen Bevölkerungsgruppe zugeschrieben werden (Kruse *et al.*, 2009). *TRPM4* kodiert einen CAN-Kanal (Calcium-aktivierter non-selektiver Kationenkanal). Die identifizierte heterozygote Mutation, bei der ein Glyzin-Rest durch einen Alanin-Rest getauscht war (c.19G→A) verursachte eine erhebliche Funktionssteigerung des Kanals (Kruse *et al.*, 2009; Stallmeyer *et al.*, 2012). 2010 wurden Gene einer libanesischen und zweier französischer Familien mit einem CCB (cardiac conduction block) analysiert, wodurch drei neue Missense-Mutationen im *TRPM4*-Gen identifiziert werden konnten (Liu *et al.*, 2010). Anhand verschiedener Studien konnte gezeigt werden, dass K_{2P}-Kanäle mit dem Auftreten von verschiedenen Pathologien in Verbindung standen. TASK-4 konnte durch

Friedrich *et al.* als mögliches neues Arrhythmie-Gen identifiziert werden. Die krankheitsauslösende Mutation, TASK-4^{G88R}, schien demnach mit einer progressiven Form der kardialen Reizleitungsstörung assoziiert zu sein.

Den Hintergrund einer umfangreichen Genanalyse, welche zu der Identifikation der bisher unbekannten pathogenen Mutation TASK-4^{G88R} führte, war das Krankheitsbild eines 63-jährigen Patienten mit dem klinischen Bild einer schweren progressiven kardialen Reizleitungsstörung in Kombination mit einem idiopathischen Kammerflimmern (idiopathic ventricular fibrillation = IVF). Die klinische Symptomatik bestand aus rezidivierenden Synkopen und ventrikulären Tachykardien. Im Ruhe-EKG zeigte sich ein AV-Block I° sowie ein progressiver Rechtsschenkelblock. Weder eine Koronarangiographie noch eine kardiale MRT ergab einen pathologischen Befund. Dem Patienten wurde therapeutisch ein ICD (implantierbarer kardioverter Defibrillator) implantiert. Die Familienanamnese war blande in Bezug auf plötzlichen Herztod sowie erblich bedingte Herzerkrankungen. Um mögliche neue Erkenntnisse zu erblich bedingten Ursachen der PCCD zu gewinnen, wurde das genetische Material des anfangs genannten Patienten hinsichtlich bisher unbekannter Schlüsselgene für die progressive kardiale Reizleitungsstörung sequenziert. Durch eine konventionelle DNS-Sequenzierung nach Sanger konnte zunächst eine neuartige Mutation einer Spleißstelle in Exon 22 von *SCN5A* identifiziert werden. Die Sequenz kodiert den Teil eines intrazellulären Linkers zwischen zwei Transmembransegmenten von Na_v1.5. Das Überspringen von Exon 22 in der Sequenz führte zu einem Funktionsverlust des Kanals (Schott *et al.*, 1999). Ergänzend wurde aufgrund des stark progredienten Verlaufes und des ungewöhnlichen Phänotyps aus idiopathischem Kammerflimmern und PCCD, welcher durch die untersuchte *SCN5A*-Mutation allein nicht plausibel erklärt werden konnte, eine Analyse mittels des WES-Verfahrens (whole-exom sequencing) durchgeführt. Hierdurch konnte eine Mutation in dem Gen *KCNK17* identifiziert werden, welches für den pH-sensitiven K_{2P}-Kanal TASK-4 kodiert (Decher *et al.*, 2001). Genauer gesagt handelte es sich um die heterozygote Mutation p.Gly88Arg (TASK-4^{G88R}), welche sich im M1P1-Linker des Proteins befindet. Der Glyzin-Rest an dieser Stelle ist streng konserviert. Alle Evaluationen mit PPTs (pathogenicity prediction tool) ergaben eine Einstufung von TASK-4^{G88R} als pathogen. Leider stimmten die übrigen Familienmitglieder einer genetischen Untersuchung nicht zu, so dass unklar blieb, ob die identifizierten Mutationen in den Genen *SCN5A* und *KCNK17* hereditären Ursprungs waren oder *de novo* entstanden sind. Die Kombination aus PCCD und einer IVF unterschied diesen Patientenfall von bisherigen Untersuchungen an Familien, in denen Träger von genetischen Mutationen typische Symptome einer PCCD zeigten und mit einem entsprechenden Herzschrittmacher therapiert werden konnten. (Schott *et al.*, 1999).

Um in Bezug auf etwaige funktionelle Konsequenzen und den krankheitsauslösenden Mechanismus von TASK-4^{G88R} neue Erkenntnisse gewinnen zu können, wurden *Xenopus laevis* Oozyten als Expressionssystem für elektrophysiologische Messungen verwendet. TASK-4^{G88R} fiel durch einen um den Faktor 3 erhöhten Auswärtsstrom im Vergleich zum TASK-4^{WT} auf. Die Mutante wies keine Auffälligkeiten im zellulären Verteilungsmuster oder in Bezug auf die Oberflächenexpression im Vergleich zum TASK-4^{WT} auf (Zerangue *et al.*, 1999; Decher *et al.*, 2004). Die Stromerhöhung musste in Folge dessen mit einer veränderten Einzelkanalamplitude oder Einzelkanalöffnungswahrscheinlichkeit des Kanals verbunden sein. Homologiemodelle ließen vermuten, dass die Mutation in der Nähe des Selektivitätsfilters lokalisiert ist (Abb. 2.9 A). Friedrich *et al.* überprüften zunächst, ob die Mutation TASK-4^{G88R} eventuell eine veränderte pH-Sensitivität verursachte. Nur bei einem sehr alkalischen pH-Wert von 10,5 zeigte sich eine minimale Abschwächung des Auswärtsstroms und somit auch nur allenfalls in diesem Bereich eine veränderte pH-Abhängigkeit (Abb. 2.9 B).

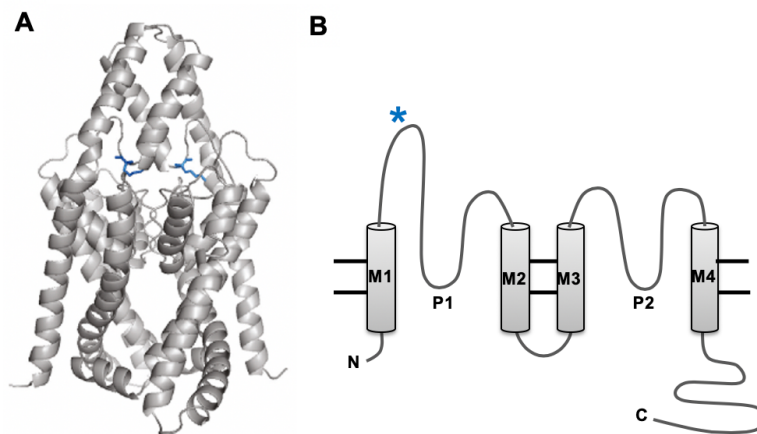


Abb. 2.9: Lokalisation des G88 Residuums in einem TASK-4 Homologiemodell basierend auf TWIK-1 (A) sowie in einer schematischen Darstellung einer K₂P-Untereinheit (B)

- A Homologiemodell basierend auf der kristallinen Struktur von TWIK-1. Die Arginin-Reste sind blau markiert. (modifiziert nach Friedrich *et al.*, 2014)
- B Schematische Darstellung. M1-M4 bezeichnen die Transmembrandomänen, P1 und P2 die Porendomänen. Der N- sowie der C-Terminus befinden sich intrazellulär. Die Lokalisation von G88 im extrazellulären M1P1-Linker ist mit einem blauen Stern markiert.

Die Möglichkeit einer veränderten Öffnungswahrscheinlichkeit der Kanäle durch Ladungsänderungen wurde anhand weiterer Mutationen, TASK-4^{G88K} (Lysin) und TASK-4^{G88E} (Glutamat), untersucht (Friedrich *et al.*, 2014). Tatsächlich wiesen TASK-4^{G88K}-Mutanten einen 7,3-fach, TASK-4^{G88E}-Mutanten einen 3,6-fach erhöhten Auswärtsstrom im Vergleich zum TASK-4^{WT} auf. Die Ladungsänderung an der Position 88 durch Einführung einer sauren Aminosäure

(Glutamat) sowie von basischen Aminosäuren (Lysin, Arginin) resultierte nachweislich in einer Funktionssteigerung der Kanäle (Friedrich *et al.*, 2014). Gemeinsam ist diesen drei Aminosäuren, dass sie einen großen strukturellen Aufbau haben. Führt man eine strukturell kleinere Aminosäure (Alanin-TASK-4^{G88A}) an dieser Position ein, so war der Auswärtsstrom nur unwesentlich höher (Friedrich *et al.*, 2014). Die Analysen zeigten, dass die geringe Größe der Aminosäure an Position 88 essentiell für eine normale Kanalfunktion von TASK-4 war. Es wurde postuliert, dass die starke Stromerhöhung von TASK-4^{G88R} durch die physikochemischen Eigenschaften des Aminosäurerestes bedingt sein könnte (Friedrich *et al.*, 2014).

Es wurden mechanistische Untersuchungen der identifizierten Mutation an HL-1-Zellen (eine Zelllinie von spontan kontrahierenden Kardiomyozyten) durchgeführt, um weiteren Aufschluss über mögliche Effekte auf das Reizleitungssystem zu erhalten (Claycomb *et al.*, 1998). Mit dem Patch-Clamp-Messverfahren konnte die Aktionspotential-Frequenz dieser Zellen mittels Transfektion eines EGFP-markierten TASK-4^{WT} beziehungsweise eines TASK-4^{G88R} Kanals gemessen werden (Friedrich *et al.*, 2014). Bei TASK-4^{G88R} transfizierten Zellen zeigte sich im Vergleich zum TASK-4^{WT} eine Aggravierung der Wildtyp-Effekte. Die Frequenz war deutlich verlangsamt, die Dauer des Aktionspotentials signifikant verkürzt, während das maximale diastolische Membranpotential stärker hyperpolarisiert war. Dieser Effekt konnte durch eine deutlich ausgeprägtere Nachhyperpolarisationsphase quantifiziert werden. Zudem zeigte sich ein negativer Effekt auf die Depolarisation, welcher durch eine Herabsetzung des Overshoots und eine zusätzlich verlangsamte Aufstrichgeschwindigkeit zustande kam. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Funktionsgewinn bei TASK-4^{G88R} das Ruhemembranpotential in Zellen des Reizleitungssystems hyperpolarisiert und in Kombination mit dem Funktionsverlust des Natriumkanals, welcher sich ebenfalls negativ auf die Depolarisation auswirkt, die Reizleitungsgeschwindigkeit deutlich herabsetzt, wie es bei der PCCD der Fall ist (Friedrich *et al.*, 2014).

2.3. Zielsetzung dieser Arbeit

Mit TASK-4^{G88R} wurde die erste Ionenkanal Mutation beschrieben, die zu einem dominant aktiven Funktionsgewinn führt und die funktionelle Relevanz eines K_{2P}-Kanals im Herzen anhand einer humanen Mutation nachweist (Friedrich *et al.*, 2014).

TASK-4^{G88R} zeigte im Vergleich zum TASK-4^{WT} einen dreifach erhöhten Auswärtsstrom, der nicht aus einer veränderten Kanaldichte an der Plasmamembran resultierte und damit auf veränderte Einzelkanalcharakteristika schließen ließ (Friedrich *et al.*, 2014). Jedoch wurde TASK-4^{G88R} bisher noch nicht auf Einzelkanalebene untersucht. Aufgrund dessen stellte ein zentrales Ziel dieser Arbeit die detailliertere elektrophysiologische Charakterisierung von TASK-4^{G88R} auf Einzelkanalebene unter Verwendung der etablierten Patch-Clamp-Methode dar. Damit sollte geklärt werden, ob die Stromerhöhung die Folge einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit der Mutante ist oder aus einer erhöhten Einzelkanalleitfähigkeit resultiert.

Bei der Mutation TASK-4^{G88R} kommt es zu einem Austausch einer kleinen ungeladenen Aminosäure (Glyzin) in eine große, basische Aminosäure (Arginin). Folglich könnte sowohl die Größe des Aminosäurerestes als auch dessen Ladung für die beobachtete Stromzunahme verantwortlich sein. Deshalb sollten systematisch alle 20 möglichen Aminosäuren an Position 88 durch positionsgerichtete Mutagenese eingeführt werden. Diese Kanal-Mutationen sollten dann in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und mit der Zwei-Elektroden Spannungsklemme untersucht werden, um nähere Erkenntnisse darüber zu gewinnen, welche physikochemischen Eigenschaften an dieser Position die Kanalfunktion entscheidend beeinflussen könnten. Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit war, ob die Stromerhöhung von TASK-4^{G88R} indirekt über einen Einfluß auf den pH-Sensor erfolgt. Dazu sollte die pH Abhängigkeit von TASK-4^{G88R} im Bereich von pH 7,5 bis pH 10,5 untersucht werden und diese mit der des TASK-4^{WT} und TASK-4^{K242H} verglichen werden. Zudem sollte die TASK-4^{G88R/K242H} Doppelmutante bezüglich ihrer pH-Abhängigkeit im Vergleich zu den genannten Mutanten untersucht werden, um einen Einfluss der TASK-4^{G88R} Mutante auf die extrazelluläre pH-Abhängigkeit ausschließen oder nachweisen zu können.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Elektrophysiologie

3.1.1. Versuchstiere

Als Modellsystem für die elektrophysiologischen Untersuchungen dienten die Oozyten von südafrikanischen Krallenfröschen (*Xenopus laevis*). Diese eignen sich sehr gut als heterologes Expressionssystem, da sie eine hohe Translationsfähigkeit besitzen und darüber hinaus eigenständig posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierung und Acetylierung durchführen. Die Erfahrungswerte zeigen, dass Ionenkanäle korrekt in die Zellmembran eingebaut werden. Die einfache Gewinnung und die Größe sind ein weiterer Vorteil dieses Expressionssystems. Für elektrophysiologische Messungen werden Oozyten verwendet, die sich in einem finalen Vorläuferstadium in der Entwicklung zur reifen Eizelle befinden und noch nicht den Eileiter durchlaufen haben (Numberger & Draguhn, 1996). Die Tierhaltung sowie die an den Tieren durchgeführten Eingriffe wurden gemäß den Richtlinien „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“, publiziert 1996 durch die „US National Institutes of Health (No. 85-23)“, durchgeführt und durch die örtliche Ethikkommission (Regierungspräsidium Giessen) genehmigt.

3.1.2. Isolation der Oozyten

Zunächst wurde der zu operierende Frosch in einer 0,15%igen Tricaine (SIGMA) Lösung anästhesiert und nach Überprüfung des vollständigen Wirkungseintritts des Narkotikums (Prüfung der Reflexe) auf Eis gelagert. Mit einem Skalpell erfolgte die Inzision der Bauchdecke in einer Länge von ca. 0,5 -1 cm. Durch den Hautschnitt konnten nun die Oozyten exzidiert werden, welche in einem Zellverband aus Bindegewebe und Blutgefäßen liegen. Der Hautschnitt wurde nach erfolgreicher Entnahme durch eine Einzelknopfnäht verschlossen und der Frosch in ein Wasserbad zwecks Observation während der Aufwachphase gesetzt. Der Oozytenstrang wurde mit Pinzetten portioniert und in Ca^{2+} freier Lösung (OR2-Lösung: NaCl 82.5 mM, KCl 2 mM, MgCl_2 1 mM, HEPES 5 mM, pH 7,4) 3-5mal gewaschen.

Im nächsten Schritt wurden die Oozyten aus dem Bindegewebe sowie der Aderhaut herausgelöst.

Dies erfolgte durch die Inkubation in einer Kollagenase-Lösung (1,5 mg/ml, Worthington, Type II), welche etwa zwei Stunden bei 16°C geschwenkt wird. Abschließend wurden die Oozyten mit einer OR2-Lösung gespült und manuell unter mikroskopischer Betrachtung sortiert. Für eine repräsentative elektrophysiologische Versuchsdurchführung sollten die Oozyten eine durchschnittliche Größe von 1-1,2 mm haben, frei von Aderhaut und etwaigen Verletzungen der äußeren Eihaut sein.

Bis zur Versuchsdurchführung wurden die Oozyten in einer Aufbewahrungslösung (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, 50 mg Gentamycin, 274 mg Natrium-Pyruvat, 88 mg Theophyllin) bei 18 °C gelagert.

3.1.3. Injektion der cRNA in *Xenopus laevis* Oozyten

Die zur Injektion verwendeten Glaskapillaren wurden durch den Pipettenzieher „DMZ-Universal Puller“ (Zeitz) aus Borosilikat-Kapillaren (Science Products) hergestellt und im Anschluss mittels „Microforge“ (Narishige) nachbearbeitet. Das Einbringen der cRNA (50 nl/Oozyte) in das Zytoplasma der Oozyten erfolgte durch einen Mikroinjektor.

Bis zum Beginn der Experimente wurden die Oozyten in Aufbewahrungslösung bei 18 °C für 48 Stunden gelagert. Die verschiedenen pH-Werte wurde mit NaOH oder HCl Lösung eingestellt und mit dem pH-Meter „Five Easy FE20“ (Mettler Toledo) kontrolliert.

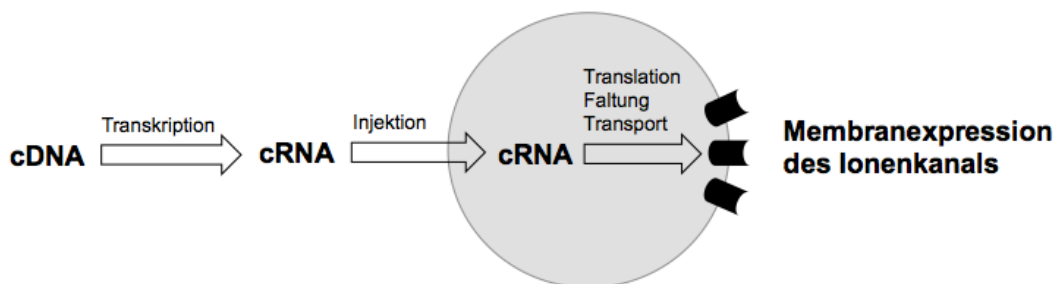


Abb. 3.1: Schematische Darstellung: Prozess der Expression von exogenen Proteinen in *Xenopus* Oozyten
 Nach Linearisierung der Plasmid-DNA durch Restriktionsendonukleasen (3.2.4.) und Aufreinigung erfolgte eine *in vitro* Transkription und Fällung der cRNA durch eine LiCl Präzipitation (3.2.5.). Die cRNA wurde dann in das Zytoplasma der Oozyte injiziert (3.1.3.). Nach Translation, Faltung und Transport werden die Proteine (Ionenkanäle) in der Plasmamembran exprimiert (modifiziert nach Bianchi *et al.*, 2006).

3.1.4. Messlösungen

Soweit nicht anders beschrieben wurde für die Messungen mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (siehe 3.1.5.) eine extrazelluläre Lösung (ND96 Lösung) bestehend aus 96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES verwendet. Der pH-Wert wurde mittels NaOH bzw. HCl eingestellt und betrug zwischen 7,5 und 10,5, je nach Messlösung. Die Pipettenlösung bestand aus einer 3 M KCl-Lösung. Für die Messungen mit der Patch-Clamp-Technik (3.1.6.) bestand sowohl die extrazelluläre als auch die Pipettenlösung aus 150 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM EGTA und 10 mM HEPES. Hier wurde die extrazelluläre Lösung mittels NaOH bzw. HCl auf einen pH-Wert von pH 7,5 eingestellt, der pH-Wert der Pipettenlösung betrug je nach Versuchsdurchführung zwischen 7,5 und 10,5. Für die zuverlässige Einstellung des entsprechenden pH-Wertes diente das pH-Meter „Five Easy FE20“ (Mettler Toledo).

3.1.5. Die Zwei-Elektroden Spannungsklemme (TEVC)

Die Zwei-Elektroden Spannungsklemme, auch TEVC (Two-electrode voltage-clamp) genannt, dient der Aufzeichnung von Ionenströmen der gesamten Membranoberfläche. Während der Aufzeichnungen kann das gewünschte Membranpotential festgelegt (geklemmt) und die extrazelluläre Badlösung modifiziert werden. Eine *Xenopus laevis* Oozyte, welche in der Badlösung liegt, wird mit zwei Mikroelektroden verbunden, die sich wiederum in jeweils einer Glaspipette mit der Pipettenlösung (3 M KCl) befinden (Abb 3.2). In der Messkammer mit der Badlösung befindet sich eine Referenzelektrode (Badelektrode). Mittels Referenz- und Spannungselektrode kann die Potentialdifferenz zwischen dem Intrazellularraum und der Badlösung bestimmt werden, das Potential der Badlösung ist dabei per Definition 0. Der pH-Wert der Badlösung wurde in verschiedenen Versuchen zwischen 7,5 und 10,5 variiert. Die zweite Mikroelektrode wird als Stromelektrode bezeichnet. Über diese Elektrode kann ein Strom appliziert werden, der zur Aufrechterhaltung der Sollspannung notwendig ist. Welche Spannung in welcher Zeit über die Membran appliziert werden soll, kann mittels eines individuell erstellten Spannungsprotokolls per Computer bestimmt werden. Spannungselektrode und Referenzelektrode kontrollieren dabei die Übereinstimmung von ausgewähltem Membranpotential und tatsächlich vorhandenem Potential im Versuchsaufbau. Über die Stromelektrode kann nun das Membranpotential entsprechend moduliert werden, was in diesem Zusammenhang bedeutet, dass es dem gewünschten Potential angepasst wird. Kommt es nun im Zuge der Modulation des Membranpotentials über die

Stromelektrode zu einem Ionenstrom, so verändert sich das tatsächliche Membranpotential. (Dascal *et al.*, 2001). Diese Potentialänderungen wurden mittels Spannungselektrode und Referenzelektrode erfasst, durch einen angeschlossenen Verstärker („Axoclamp 900A“, Axon Instruments) aufgezeichnet und über einen Analog/Digital-Wandler („Digidata 1440A“, Axon Instruments) an den Computer vermittelt und auf einem Bildschirm dargestellt. Die Höhe der Anpassungsleistung der Stromelektrode zeigte sich als Stromamplitude im Messprotokoll. Folgende Programme wurden verwendet: eine Steuersoftware für den Verstärker („Axoclamp“, Molecular Devices), eine Software zur Erfassung zur Datenerfassung („Clampex“, Molecular Devices) und eine Software für die Auswertung („ClampFit“, Molecular Devices).

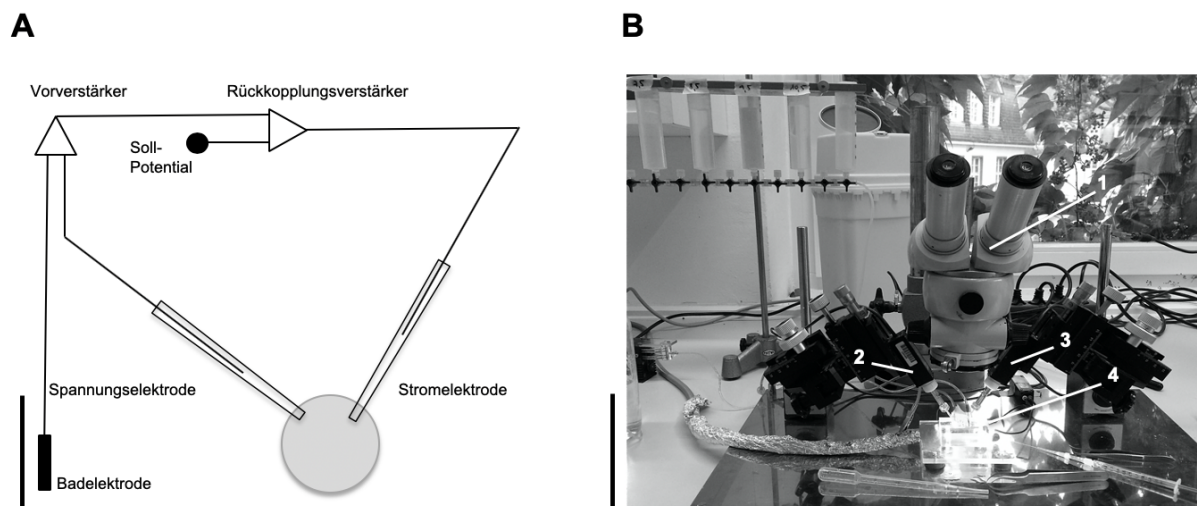


Abb. 3.2: Funktionsprinzip und Aufbau eines TEVC-Messplatzes

- A Vereinfachte schematische Darstellung der TEVC Technik (modifiziert nach Dascal *et al.*, 2001)
 B Abbildung des Messplatzes: (1) Mikroskop (2) Spannungselektrode (3) Stromelektrode (4) Messkammer mit Badelektroden

3.1.6. Einzelkanalmessungen mit der Patch-Clamp-Methode

Bei dem Patch-Clamp-Verfahren handelt es sich ebenfalls um das Prinzip einer Spannungsklemme, jedoch kann hier mittels nur einer Mikroelektrode sowohl Spannungs- als auch Strommessung erfolgen. Dadurch können die Ströme einzelner Kanäle im pA-Bereich sichtbar gemacht werden (Single-Channel-Recording), so dass sich diese Technik als geeignet für die in dieser Arbeit zu untersuchenden Stromamplituden erwies, welche verhältnismäßig klein sind.

Neben der Messung der Membranleitfähigkeit kann hier sowohl das intra- als auch das extrazelluläre Medium vorgegeben werden. Hohe zeitliche Auflösung und die Möglichkeit eines schnellen Wechsels der extrazellulären Lösung stellen weitere Vorteile dar und erhöhen die Genauigkeit der Messungen. Zur Abschirmung von äußeren Störungseinflüssen befindet sich der Versuchsaufbau in einem Faradayschen Käfig (Abb. 3.3). Prinzip ist hier ebenfalls die Versuchsdurchführung am Modell einer Zelle, im Falle dieser Arbeit eine Oozyte von *Xenopus laevis*, die sich in einer Messkammer befindet. Diese Messkammer befindet sich auf dem Objekttisch eines aufrechten Mikroskops. Sie wird mit der in 3.1.4. genannten Messlösung fortwährend perfundiert und ist mit einer Badelektrode versehen. Die Perfusionsgeschwindigkeit betrug bei den durchgeführten Versuchen 1,25 ml/min.

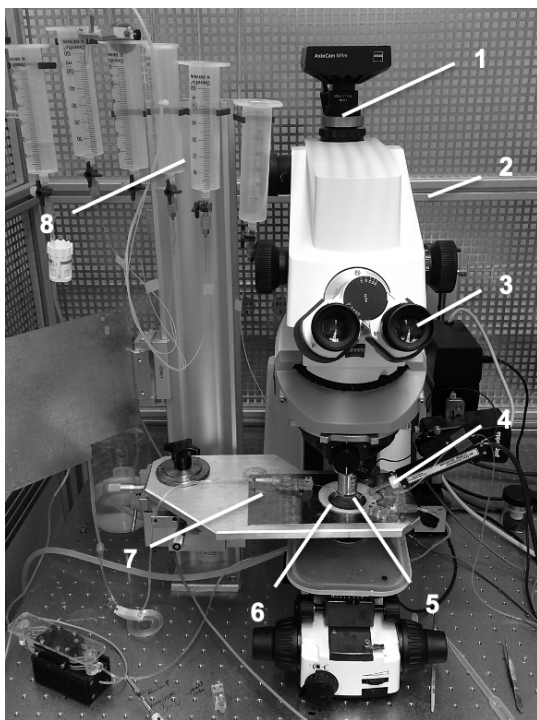


Abb. 3.3: Darstellung eines Patch-Clamp-Messplatzes

In einem Faraday'schen Käfig (2) befindet sich ein Mikroskop (3) mit einem Kamera-Aufsatz (1) und der Messkammer (6) auf einem schwingungsgedämpften Objekttisch. In der Kammer befindet sich die Badelektrode (5). Die Messelektrode (4) befindet sich seitlich und ragt in die Messkammer. In den fixierten Gefäßen befindet sich die Messlösung (8), welche über ein Schlauchsystem (7) der Messkammer zugeführt wird.

Die visuelle Kontrolle, notwendig zur Positionierung der Oozyte sowie der Pipette, erfolgte mittels der Kamera „Olympus 150“ (Olympus). Die Patch-Elektrode dient in dem verwendeten Versuchsaufbau dem Zugang zu einem Membranfleck (Patch) und besteht aus einem chlorierten Ag/AgCl-Silberdraht. Zwecks Isolierung sowie der Einbringung der Pipettenlösung befindet sich

die Elektrode in einer Borosilikatglaskapillare, die bei jeder Experimentdurchführung erneuert werden muss.

Die Kapillaren wurden mittels des Pipettenziehers „DMZ-Universal Puller“ (Zeitz) hergestellt und verfügten über einen Widerstand zwischen 5-10 M Ω . Der Elektrodenhalter verfügt über eine Öffnung, welche mit einem U-Rohr zur Druckmessung- und -vorgabe verbunden ist. Eingestellt wird der Druck mittels einer Spritze, die durch einen Schlauch mit dem System verbunden ist. Anfangs wurde hier ein leichter Überdruck appliziert, um etwaige Verschmutzungen aus der Pipette zu entfernen. Die Membran wurde nun mittels der Pipettenspitze durch Unterdruck „angesaugt“, bis der elektrische Widerstand konstant 1 G Ω überschritten hat. Auf diese Weise wurde ein stabiler „Cell-attached-Seal“ erstellt. Dieser Seal ist wichtig, um „*inside-out*“-Patches zu generieren, die dadurch entstehen, dass die Pipette ruckartig von der Membran weggerissen wird. Dadurch befindet sich die vormals zytoplasmatische Membran in Richtung der Badlösung (Abb. 3.4).

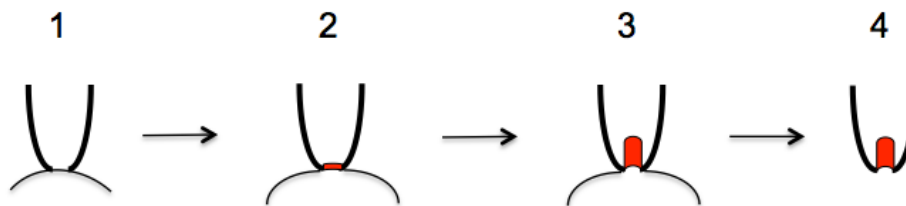


Abb. 3.4: Illustration der Generierung eines Membran-Patches

- 1 Die Pipette liegt der Zellmembran locker auf (loose Patch-Clamp)
- 2 Die Zellmembran wird durch Unterdruck in die Pippenspitze gesaugt (Cell-attached)
- 3 Liegt stabiler „Cell-attached-Seal“ vor, wird die Pipette zurückgezogen
- 4 Ein „*inside-out*-Patch“ wurde durch das partielle Abziehen der Membran generiert (modifiziert nach Sakmann & Neher, 1995)

Nun konnten durch definiert aufgezwungene Potentiale entstehende Ionenströme mittels eines zwischengeschalteten Verstärkers („Axopatch 200B“, Axon) sowie eines Analog/Digital-Wandlers („Digidata 1440A“, Axon Instruments) gemessen und aufgezeichnet werden.

Zu beachten ist hier die sogenannte Vorzeichenkonvektion. Da die Außenseite der Membran noch immer in Richtung der Pipette liegt, müssen die gemessenen Signale zur korrekten Darstellung invertiert werden. Ströme aus der Oozyte in Richtung der Pipette sind hier Auswärtsströme (in einer grafischen Darstellung nach unten zeigend). Entsprechend umgekehrt verhält es sich mit den Einwärtsströmen (Numberger & Draguhn, 2001). Für eine optimale Aussagekraft der Stromamplituden wurde eine symmetrische K⁺-Konzentration von 150 mM (Hoch-K⁺-Lösung)

für die Pipetten- und Badlösung gewählt, welche am ehesten der intrazellulären K^+ -Konzentration entspricht. Dies führt nach der Nernst-Gleichung zu einer Verschiebung des K^+ -Gleichgewichtspotentials von -80 mV auf 0 mV, die treibende Kraft für den Auswärtsstrom von K^+ -Ionen wird geringer und die Charakterisierung der Ionenströme bei den verschiedenen Potentialen erleichtert. Der pH-Wert der Badlösung lag in allen experimentellen Durchgängen bei 7,5. Als extrazellulärer pH-Wert über die Pipetten-Lösung wurde 8,5 gewählt, um die Kanäle entsprechend zu aktivieren. Probatorisch wurden Durchgänge mit einem extrazellulären pH-Wert von 9,5 und 10,5 durchgeführt, jedoch waren die Einzelkanalamplituden aufgrund der überschießenden Kanalaktivität nicht zufriedenstellend beurteilbar und die Integrität der Zelle wurde durch die stark alkalischen pH-Werte negativ beeinflusst.

Die Charakterisierung hinsichtlich der Leitfähigkeit erfolgte über die Ermittlung der Stromamplitude der Einzelkanäle. Die Berechnung der Leitfähigkeit erfolgte nach dem Ohm'schen Gesetz: $U=R \cdot I$. Um die Leitfähigkeit des jeweiligen Kanals zu bestimmen, wurde ein Messprotokoll verwendet, über welches stufenweise eine festgelegte Spannung über die Spannungsklemme an die Zellmembran anlegt wird.

3.1.7. Datenanalyse und statistische Auswertung

Die Datenerfassung erfolgte durch das Programm „Clampex 10.0“ (Molecular Devices), bei der anschliessenden Auswertung wurde das Programm „Clampfit 10.0“ (Molecular Devices) verwendet. Alle Werte der statistischen Analyse wurden mit Hilfe des Programms Excel (Microsoft) ermittelt. Zu vergleichende Datensätze wurden anhand des zweiseitigen Student-t-Tests auf signifikante Unterschiede untersucht. Der p-Wert ist definiert als das Maß der Irrtumswahrscheinlichkeit, das heisst die Wahrscheinlichkeit, dass die erfassten Datensätze sich nicht statistisch unterscheiden. Das Verhältnis von p-Wert und Signifikanz verhält sich umgekehrt proportional, je geringer der p-Wert desto höher die Signifikanz. Ein p-Wert kleiner als 0,05 (*) bzw. 0,01 (**) oder 0.001 (***) gilt als signifikant und wurde entsprechend gekennzeichnet.

Die Erstellung von graphischen Darstellungen, basierend auf erhobenen Datensätzen erfolgte mit dem Programm OriginPro7 (OriginLab Corporation).

3.2. Molekularbiologie

3.2.1. Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

Für die DNA-Vermehrung wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* DH5 α verwendet. Der Hersteller *Invitrogen* unterzieht die Zellen einer chemischen Vorbehandlung, wodurch diese eine Kompetenz für DNA-Transformationen mittels Hitzeschock erlangen. Im Rahmen der Transformation wird rekombinante DNA in das Bakterium eingebracht. Die Bakterienzelle nimmt die fremde DNA auf und vervielfältigt sie. Für diesen Schritt wurden 80 μ l DH5 α -Zellen auf Eis langsam aufgetaut. Im Anschluss wurde die Plasmid-DNA hinzugefügt und die Bakterienzellen vorsichtig mit der DNA gemischt. Daraufhin wurde die Suspension für 30 Minuten auf Eis inkubiert, darauffolgend für eine Minute auf 37°C erhitzt und anschließend für weitere zwei Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zufügen von 900 μ l LB-Medium wurde der Ansatz für eine Stunde bei 37 °C geschüttelt. Im Anschluss folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 5000 rpm. Der entstandene Medienüberstand wurde verworfen, das Bakterienpellet in dem verbliebenen Medienrückstand resuspendiert und auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Bei der Herstellung des LB-Mediums wurde ein Antibiotikum hinzugegeben (3.2.4.), welches zwecks Selektion benötigt wird. Der plattierte Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Alle verwendeten Plasmide trugen ein Resistenzgen gegen Ampicillin. Für die Herstellung einer Stammlösung wurde das Antibiotikum (Ampicillin, Roth), welches als Pulver geliefert wurde, in ddH₂O gelöst. Die Konzentration betrug 100 mg/ml. Im Anschluss wurde die Lösung aliquotiert und bei -20°C gelagert. Im LB-Medium oder LB-Agar betrug die endgültige Konzentration 100 μ g/ml.

Für die Durchführung einer schnellen Retransformation wurden 25 μ l DH5 α Zellen mit ca. 1 μ l (100 ng) Plasmid-DNA gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen fünf Minuten bei einer Temperatur von 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden anschließend auf LB-Agarplatten mit dem jeweiligen Antibiotikum ausplattiert.

3.2.2. Plasmidisolierung aus Bakterien

Von den LB-Agarplatten wurden nach der Inkubation über Nacht einzelne Bakterienkolonien isoliert und in 2 ml LB-Medium mit Antibiotikumzusatz bei 37 °C als Schüttelkultur über Nacht kultiviert. Die Kulturen wurden am nächsten Tag in 2 ml Eppendorf-Gefäße überführt, für eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert und danach der Überstand verworfen.

Zur Isolierung der Plasmid-DNA aus den kultivierten Bakterienzellen wurde das „Plasmid Mini Kit I“ (E.Z.N.A.) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Plasmid-DNA wurde in autoklaviertem ddH₂O eluiert und bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.3. Positionsgerichtete Mutagenese

Die positionsgerichtete Mutagenese wurde auf Basis der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter der Verwendung des „Site directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Reaktionslösung für die PCR enthielt 2 mM MgCl₂, 0,5 µM dNTP-Mix, 1 µM Primer (Invitrogen, forward und reverse mit der jeweiligen Mutation), 2,5 µl Turbo DNA-Polymerase, 5µl 10fach-Puffer, 2 µl cDNA (5 ng/µl).

Die PCRs wurden in einem „MJ Mini Gradient Thermal Cycler“ (Bio-Rad) durchgeführt. Bei der PCR wurde die DNA in einem ersten Schritt durch ein Erhitzen auf 95°C über einen Zeitraum von 30 Sekunden denaturiert, also in Einzelstränge aufgetrennt. Hierauf folgt in einem zweiten Schritt bei einer Temperatur von 55°C die Anlagerung der spezifischen Primer mit einem Zeitfenster von 1 Minute. Die Elongation erfolgt bei 68°C für 1 Minute/kb. Diese Abfolge wurde insgesamt 16mal wiederholt. Hiernach erfolgte der enzymatische Verdau durch die Restriktionsendonuklease DpnI, die Transformation der Plasmid-DNA in Bakterien, die Plasmidisolierung aus den Bakterien und die Sequenzierung.

3.2.4. Linearisierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA

Für die Synthese von cRNA (*in vitro* Transkription) muss die Plasmid-DNA zuvor linearisiert werden. TASK-4 (Accession Nummer AF358910.1) im Expressionsvektor pSGEM (Villmann *et al.*, 1997) wurde durch den Einsatz von Restriktionsendonukleasen linearisiert. Diese Enzyme erkennen spezifische DNA-Sequenzen und schneiden dort gezielt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Endonukleasen wurden von den Firmen MBI Fermentas (St. Leon-Rot) oder New England Biolabs (NEB) bezogen. In einem Restriktionsansatz wurde 4 µg Plasmid-DNA nach Angaben des Herstellers linearisiert. Dieser Ansatz wurde bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Danach wurde die linearisierte DNA aufgereinigt. Hierzu wurde das „Peq Gold MicroSpin Cycle Pure Kit“ (Peqlab) verwendet. Eine Qualitätsüberprüfung linearisierter DNA erfolgte mittels einer Auftrennung durch Gelektrophorese auf 1,5%igen Agarose-Gelen.

3.2.5. *In vitro* Transkription und Fällung der cRNA durch LiCl Präzipitation

Die Synthese der cRNA erfolgte mit Hilfe des „mMESSAGE mMACHINE®-Kits“ (Ambion) nach Angaben des Herstellers. Ein Syntheseansatz von 15 µl bestand aus 4,5 µl linearisierter Plasmid-DNA, 7,5 µl 2x NTP/CAP (Promoter, Sp6 oder T7), 1,5 µl 10x Reaktions-Puffer und 1,5 µl Enzym-Mix. Der Ansatz wurde bei 37 °C für 2 Stunden inkubiert. Darauf folgte eine weitere Inkubation unter dem Zusatz von 1 µl DNase I (im Kit enthalten) bei 37 °C für weitere 15 Minuten. Die Prüfung der Qualität des Ergebnisses erfolgte ebenfalls mittels Gelektrophorese auf einem 1,5%igen Agarose-Gel. Proteine und nicht eingebaute Nukleotide im Syntheseansatz können zu Ungenauigkeiten in den Messungen führen. Daher wurden cRNAs vor der Quantifizierung aufgereinigt. Dazu wurde der cRNA-Syntheseansatz mit 25 µl LiCl-Präzipitationslösung (aus dem Kit) und 30 µl Nuklease-freiem Wasser gemischt und bei -20 °C über Nacht inkubiert. In einem weiteren Schritt folgte eine Zentrifugation (13000 rpm) über 30 Minuten bei einer Temperatur von 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das cRNA-Pellet in 80%igem EtOH gewaschen. Dieser Ansatz wurde erneut für 20 Minuten zentrifugiert (13000 rpm). Ethanol wurde vorsichtig entfernt. Das Pellet wurde im Anschluß bei 37 °C etwa 5 Minuten getrocknet und in 15-20 µl Nuklease-freiem Wasser resuspendiert. Im letzten Schritt folgte die Qualitätsprüfung durch Gelektrophorese auf einem 1,5%igen Agarose-Gel.

3.2.6 Quantifizierung von RNA und DNA

Die Konzentrationsbestimmungen von RNA und DNA in den Lösungen wurden mit dem UV-Spektrometer „Nanodrop“ (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Die Lichtabsorption wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm gemessen (OD 1: 40 ng/ μ l RNA bzw. 50 ng/ μ l DNA).

4. ERGEBNISSE

4.1. Untersuchung des der Stromerhöhung der TASK-4^{G88R} Mutation zu Grunde liegenden Mechanismus

Es wurde bereits beschrieben, dass die TASK-4 Mutation, TASK-4^{G88R}, eine dreifach erhöhte Stromamplitude im Vergleich zum TASK-4^{WT} bewirkt (Friedrich *et al.*, 2014). Untersuchungen durch Friedrich *et al.* konnten zudem zeigen, dass diese Funktionssteigerung nicht durch eine erhöhte Oberflächenexpression von TASK-4^{G88R} bedingt ist. Da auch die Einführung der Aminosäurereste Lysin und Glutamat an Position 88 zu einer Stromerhöhung führte, besteht die Annahme, dass die Aminosäure Glyzin an dieser Position eine Schlüsselrolle einnimmt. Zudem konnte man anhand der Gensequenzen orthologer Kanäle sehen, dass der Glyzin-Rest an dieser Position konserviert ist (Friedrich *et al.*, 2014). Es sollte nun untersucht werden, ob die Größe des Aminosäurerestes oder dessen chemische Eigenschaften für die beobachtete Stromzunahme verantwortlich sein könnte.

4.1.1 Die Hydrophobizität des Aminosäurerestes an Position 88 beeinflusst die Stromamplitude des TASK-4 Kanals

Um systematisch zu untersuchen, welche physikochemischen Aminosäure-Eigenschaften an Position 88 die Kanalfunktion beeinflussen könnten, wurden alle 20 Aminosäuren an Position 88 eingeführt. Die Mutanten wurden in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und die jeweiligen Stromamplituden mit Hilfe der TEVC-Technik bestimmt. Dafür wurden gleiche cRNA-Mengen (50 nl/Oozyte) injiziert. Der pH-Wert der Meßlösung lag bei 8,5, da TASK-4 in diesem pH-Bereich ausreichend große Ströme generiert. Die Stromamplituden wurden bei 0 mV ausgewertet und auf die Amplitude von TASK-4^{WT} normiert. Die Messdaten wurden dargestellt als Mittelwert \pm SEM (Abb. 4.1).

Die verschiedenen Stromamplituden wurden anhand dreier gängiger Aminosäure-Charakteristika betrachtet: Ladung, Größe/Molekulargewicht und Hydrophobizität. Wie bereits anhand der experimentellen Daten von Friederich *et al.* gezeigt werden konnte, ergaben auch die Ergebnisse aus der systematischen Untersuchung keinen neuen Hinweis darauf, dass ein reiner Ladungsaustausch an Position 88 für eine normale Kanalfunktion entscheidend sein könnte.

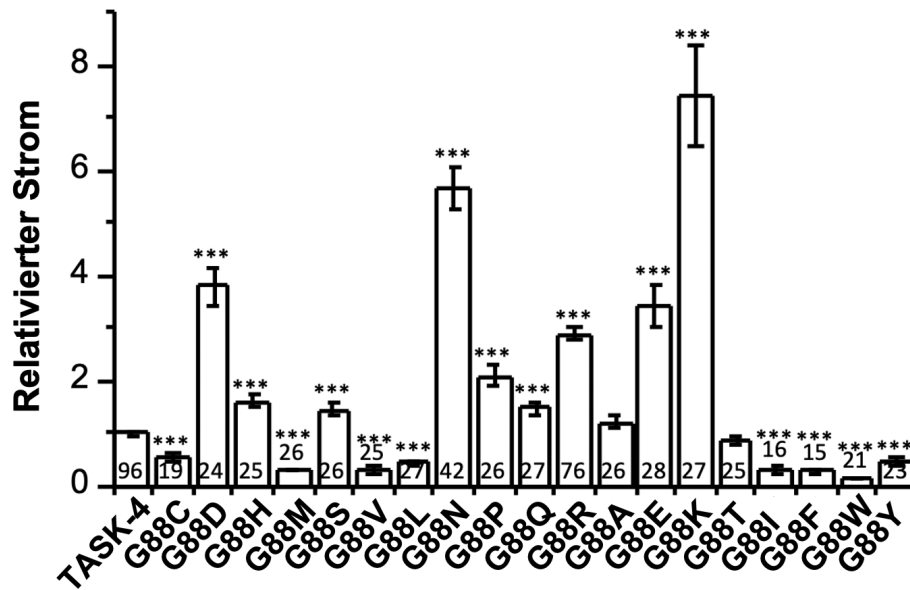


Abb. 4.1: Relativierte Stromamplituden nach Einführung 20 verschiedener Aminosäuren an Position 88 im TASK-4 Kanal

TEVC-Untersuchungen in *Xenopus* Oozyten bei pH 8,5 nach Injektion gleicher Mengen verschiedener TASK-4 cRNAs (50 nl/ Oozyte). Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV erfolgte ein Spannungssprung auf -120 mV und eine Erhöhung der Spannung von -120 bis $+40$ mV innerhalb von 4 s. Die Wiederholung der Spannungsrampe erfolgte alle 4 s. Die Analyse der Stromamplituden erfolgte bei 0 mV. Die Anzahl der gemessenen Oozyten (n) ist in den Balken vermerkt.

Nach Einführung saurer Aminosäuren (TASK-4^{G88D}, TASK-4^{G88E}) ließ sich feststellen, dass diese Mutationen in einer signifikanten Stromerhöhung resultierten. Bei TASK-4^{G88D} lag diese bei $3,80 \pm 0,36$, bei TASK-4^{G88E} bei $3,42 \pm 0,41$ im Vergleich zum TASK-4^{WT} ($1,0 \pm 0,05$). Wurden basische Aminosäuren (TASK-4^{G88K}, TASK-4^{G88H}, TASK-4^{G88R}) eingeführt, so führte dies in allen Mutanten zu signifikant erhöhten Stromamplituden im Vergleich zum TASK-4^{WT} (Abb. 4.1). Bei der Mutante TASK-4^{G88K} war der Effekt mit einer Erhöhung von $7,39 \pm 0,95$ am deutlichsten (Abb. 4.1.) Bei der Mutante TASK-4^{G88H} betrug diese $1,61 \pm 0,12$ und bei TASK-4^{G88R} $2,87 \pm 0,12$. Dementsprechend konnte die Art der Ladung nicht für die erhöhte Stromamplitude verantwortlich sein.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob die Aminosäuregröße an Position 88 von funktioneller Relevanz ist. Für eine Größeneinschätzung der jeweiligen Aminosäure diente das Molekulargewicht, welches stark mit der physischen Größe korreliert. Mutationen nach Einführung eines Aminosäurerestes mit einem sehr hohen Molekulargewicht (TASK-4^{G88Y}, TASK-4^{G88F}, TASK-4^{G88W}, TASK-4^{G88R}) zeigten im Vergleich zu TASK-4^{WT} sowohl signifikant erhöhte (TASK-4^{G88R} = $2,87 \pm 0,12$) als auch signifikant reduzierte Stromamplituden (TASK-4^{G88Y} = $0,48 \pm 0,05$, TASK-4^{G88F} = $0,29 \pm 0,05$, TASK-4^{G88W} = $0,16 \pm 0,01$) (Abb. 4.1).

Wurden leichte Aminosäure-Reste eingeführt (TASK-4^{G88A}, TASK-4^{G88V}, TASK-4^{G88S}, TASK-4^{G88T}, TASK-4^{G88C}), so resultierte dies in nicht signifikant veränderten (TASK-4^{G88A}, TASK-4^{G88T}), signifikant erhöhten (TASK-4^{G88S} = $1,46 \pm 0,14$) als auch signifikant reduzierten Stromamplituden (TASK-4^{G88V} = $0,31 \pm 0,04$, TASK-4^{G88C} = $0,53 \pm 0,07$) im Vergleich zum TASK-4^{WT} (Abb. 4.1). Allein die Größe der Aminosäure an Position 88 beeinflusste die Stromamplitude somit nicht.

Ein interessanter Effekt zeigte sich bei Betrachtung der Stromamplituden in Bezug auf die Hydrophobizität des jeweiligen eingeführten Aminosäurerestes. Befand sich an Position 88 ein hydrophiler Aminosäure-Rest (zum Beispiel TASK-4^{G88D}, TASK-4^{G88K}, TASK-4^{G88R}, TASK-4^{G88N}), so führte dies in allen Fällen zu einer signifikanten Erhöhung der Amplitude (TASK-4^{G88D} = $3,80 \pm 0,36$, TASK-4^{G88K} = $7,39 \pm 0,95$, TASK-4^{G88R} = $2,87 \pm 0,12$, TASK-4^{G88N} = $5,67 \pm 0,40$) (Abb. 4.1). Wurde jedoch ein hydrophober Aminosäure-Rest eingeführt (TASK-4^{G88F}, TASK-4^{G88I}, TASK-4^{G88V}), war die Stromamplitude dieser Mutanten im Vergleich zu der des TASK-4^{WT} signifikant reduziert (TASK-4^{G88F} = $0,29 \pm 0,05$, TASK-4^{G88I} = $0,34 \pm 0,07$, TASK-4^{G88V} = $0,31 \pm 0,04$) (Abb. 4.1). Es wurde somit wahrscheinlich, dass die jeweilige Hydrophobizität des Aminosäure-Restes an Position 88 eine essentielle Eigenschaft für eine normale Kanalfunktion sein könnte. Um diese Annahme zu verifizieren, wurde zusätzlich eine Korrelationsanalyse durchgeführt (Abb. 4.2). Hierbei wurde die relative Stromamplitude mit den Parametern Molekulargewicht, Oberfläche und Hydrophobizität der verschiedenen Aminosäuren korreliert. Als Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs der Merkmale wurde der dimensionslose Korrelationskoeffizient Pearson's r gewählt. Ein Wert von $+1/-1$ entspricht hierbei einem vollständigen linearen Zusammenhang, ein Wert von 0 entspricht keinem Zusammenhang. Betrachtet man den Zusammenhang zwischen relativer Stromamplitude und Molekulargewicht, so ist ersichtlich, dass bei einem Pearson's r Wert von 0,008 kein Zusammenhang besteht. Gleiches gilt für die Merkmale relative Stromamplitude und Oberfläche, hier zeigt sich bei einem Wert des Koeffizienten von 0,04 ebenfalls kein Zusammenhang. Zur detaillierten Überprüfung eines möglichen Zusammenhangs zwischen Hydrophobizität des Aminosäure-Restes und relativer Stromamplitude wurden zwei verschiedene gängige Hydrophobizitäts-Skalen ausgewählt, die Hydrophobizitäts-Skala nach Janin (Janin 1979) und die Eisenberg-Consensus-Skala (Eisenberg 1984). Tabelle Nummer 1 gibt einen Überblick über die Hydrophobizitäts-Werte der Aminosäuren nach der jeweiligen Skala, welche mittels des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten festgelegt werden. Je positiver der Wert ist, desto hydrophober ist die Aminosäure.

	Aminosäure	Janin (1979)	Eisenberg (1984)
I	Isoleuzin	0,70	1,38
F	Phenylalanin	0,50	1,19
V	Valin	0,60	1,08
L	Leuzin	0,50	1,06
W	Tryptophan	0,30	0,81
M	Methionin	0,40	0,64
A	Alanin	0,30	0,62
G	Glyzin	0,30	0,48
C	Cystein	0,90	0,29
Y	Tyrosin	- 0,40	0,26
P	Prolin	- 0,30	0,12
T	Threonin	- 0,20	- 0,05
S	Serin	- 0,10	- 0,18
H	Histidin	- 0,10	- 0,40
E	Glutamat	- 0,70	- 0,74
N	Asparagin	- 0,50	- 0,78
Q	Glutamin	- 0,70	- 0,85
D	Aspartat	- 0,60	- 0,90
K	Lysin	- 1,80	- 1,50
R	Arginin	- 1,40	- 2,53

Tabelle 1: Hydrophobizitäts-Skalen nach Janin (1979) und Eisenberg (1984)

Darstellung der Hydrophobizitäts-Werte der Aminosäuren nach zwei gängigen Skalen mittels des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten. Je positiver der Wert ist, desto hydrophober ist die Aminosäure. Hydrophobe Aminosäuren sind blau markiert, hydrophile rot.

Der lineare Zusammenhang zwischen der Höhe der relativen Stromamplitude und der Hydrophobizität nach der Eisenberg-Skala war bereits eindeutig (Pearson's $r = -0,72$), ließ sich jedoch nach Korrelation mit den Werten nach der Janin-Skala noch weiter verstärken. Der Korrelationskoeffizient betrug hier $-0,79$ und konnte die Annahme unterstreichen, dass die Stromamplitude mit Zunahme der Hydrophobizität eines Aminosäure-Restes geringer wird. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass eine starke Hydrophilizität des Aminosäure-Restes mit einer Erhöhung der Stromamplitude einhergeht. Die hydrophile Eigenschaft des Aminosäure-Restes an Position 88 könnte somit in der Tat einen entscheidenden Einfluss auf die Kanalfunktion haben.

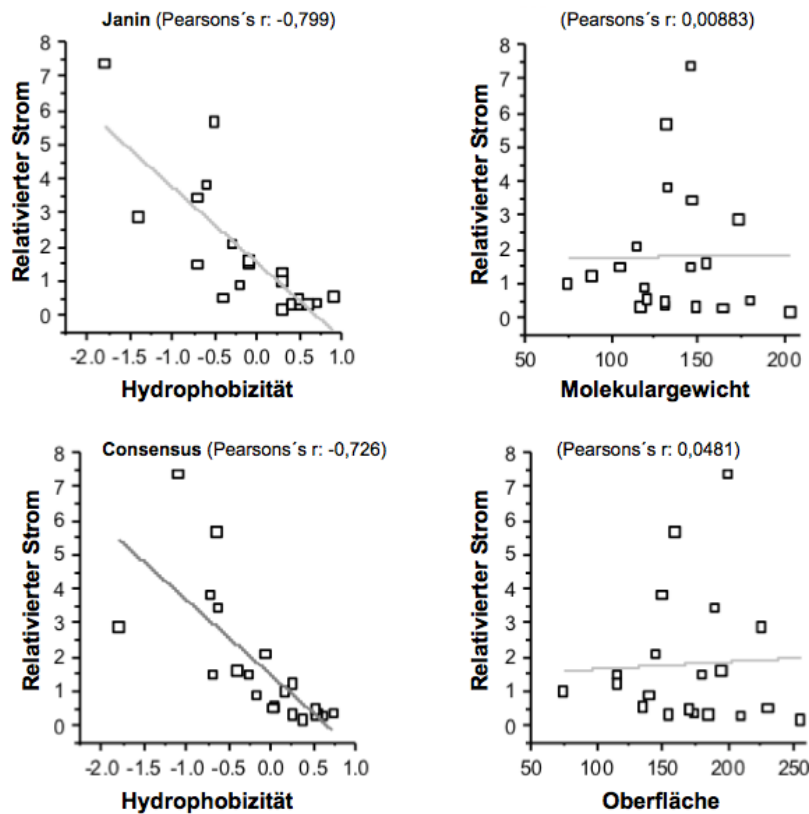


Abb. 4.2: Korrelationsanalyse

Untersuchung eines linearen Zusammenhangs zwischen den Merkmalen Molekulargewicht/Oberfläche/Hydrophobizität und der relativen Stromamplitude von TASK-4^{WT} bzw. mutierten TASK-4-Kanälen (nach systematischer Einführung aller 20 Aminosäuren an Position 88) anhand des Korrelationskoeffizienten Pearson's r .

4.1.2. Einfluss des Aminosäure-Restes an Position 88 auf die pH-Abhängigkeit

TASK-4 ist ein pH-sensitiver Kanal, der im alkalischen Bereich aktiviert wird. Deshalb sollte nun geklärt werden, ob ein Aminosäureaustausch an Position 88 die pH-Sensitivität des Kanals verändert und somit indirekt zu der erhöhten Stromamplitude führt. Mittels TEVC Messungen wurden die Stromamplituden ausgewählter Mutationen unter Variation des pH-Wertes von 7,5 bis 10,5 ermittelt. Hierfür wurden neben dem TASK-4^{WT} die Kanalmutationen TASK-4^{G88R} (basischer Aminosäurerest), TASK-4^{G88E} (saurer Aminosäurerest) und TASK-4^{G88L} (unpolarer Aminosäurerest), die unterschiedliche Stromamplituden aufweisen, untersucht (Abb. 4.3 A, B).

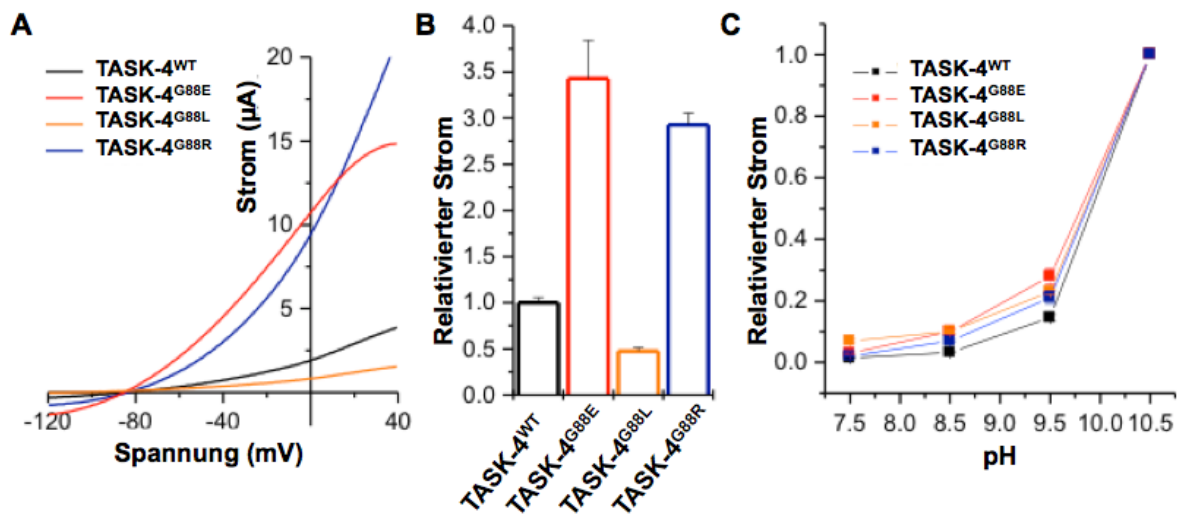


Abb. 4.3: Stromamplituden und pH-Abhängigkeit verschiedener TASK-4 Mutanten

- A Repräsentative TEVC-Messungen in *Xenopus* Oozyten bei pH 8,5 nach Injektion mit TASK-4^{WT} (schwarz) oder mutierter (TASK-4^{G88E} (rot), TASK-4^{G88L} (gelb), TASK-4^{G88R} (blau) cRNA (50 nl/ Oozyte). Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV erfolgte ein Spannungssprung auf -120 mV und eine Erhöhung der Spannung von -120 bis +40 mV innerhalb von 4 s. Eine Wiederholung der Spannungsrampe erfolgte alle 4 s.
- B Mittlere Stromamplituden von TASK-4^{WT} und TASK-4^{G88E}, TASK-4^{G88R}, TASK-4^{G88L} bei pH 8,5, analysiert bei 0 mV und normiert auf den TASK-4^{WT}. Relativierter Strom: TASK-4^{WT} = $1,0 \pm 0,05$ ($n = 96$), TASK-4^{G88E} = $3,42 \pm 0,41$ ($n = 28$), TASK-4^{G88L} = $0,47 \pm 0,04$ ($n = 27$), TASK-4^{G88R} = $2,87 \pm 0,12$ ($n = 76$)
- C Sensitivität von TASK-4^{WT} und mutierten TASK-4^{G88E}, TASK-4^{G88R}, TASK-4^{G88L} gegenüber dem extrazellulären pH-Wert. Die Analyse der mittleren Stromamplituden erfolgte am Ende des Testpulses (Protokoll wie oben beschrieben) unter Variation des extrazellulären pH-Wertes von 7,5 bis 10,5. Die Daten wurden auf die Ströme bei einem pH-Wert von 10,5 normiert und als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Die Untersuchung der jeweiligen Stromamplituden dieser Mutationen unter Variation des extrazellulären pH-Wertes zeigte eine vergleichbare Stromzunahme wie TASK-4^{WT} Kanäle, der pH₅₀ blieb konstant (Abb. 4.3 C). Folglich haben die physikochemischen Eigenschaften des Aminosäure-Restes an Position 88 keinen Einfluß auf die pH Sensitivität des TASK-4 Kanals. Niemeyer *et al.* identifizierten 2007 an einem Modell der Kanalpore von TASK-4, basierend auf der Struktur von K_v1.2, einen Lysin-Rest an Position 242 (K242), lokalisiert im Bereich des Selektivitätsfilters. Elektrophysiologische Messungen von Niemeyer *et al.* konnten zudem zeigen, dass eine Neutralisierung von K242 zu erhöhten Stromamplituden bei einem neutralen pH-Wert im Vergleich zum TASK-4^{WT} führte. G88 befindet sich im M1P1-Linker direkt oberhalb des Selektivitätsfilters, also in räumlicher Nähe zu dem pH-Sensor. Das Ziel der nachfolgenden elektrophysiologischen TEVC-Untersuchungen war es nun, ob dieser Effekt bei TASK-4 reproduzierbar ist, um dann weiterführend zu untersuchen, ob eine Doppelmutation der Aminosäurereste an Position 88 und an Position 242 einen Effekt auf die pH-Abhängigkeit zeigt. Durch positionsgerichtete Mutagenese wurden in Anlehnung an die Untersuchungen von

Niemeyer *et al.* die Aminosäurereste Alanin, Histidin oder Lysin an Aminosäureposition 242 des TASK-4 Kanals eingeführt. Durch die Mutation TASK-4^{K242A} sollte eine Neutralisierung der Position erreicht werden, während Histidin mit 6,0 einen deutlich niedrigeren pK_a -Wert als Lysin (10,8) besitzt. Hierdurch sollte sich herausstellen, ob sich die Stromamplituden entsprechend des pK_a -Wertes der jeweiligen Seitenkette modulieren lassen. Dazu wurden die TASK-4 Mutanten sowie der TASK-4^{WT} in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und entsprechende TEVC-Untersuchungen durchgeführt. Bei pH 8,5 zeigte sich eine stark erhöhte Stromamplitude für TASK-4^{K242H} ($44,15 \pm 6,33 \mu A$ bei 0 mV), während TASK-4^{K242A} eine geringere Stromamplitude als TASK-4^{WT} zeigte ($2,1 \pm 0,78 \mu A$ versus $2,3 \pm 0,17 \mu A$ bei 0 mV) (Abb. 4.4 A,B). Wichtig ist hier die Betrachtung der relativen Ströme, normiert auf einen pH-Wert von 10,5, da die Ströme im saureren pH-Bereich bei TASK-4^{K242A} und TASK-4^{WT} im Verhältnis so klein sind, dass sie grafisch schlecht darstellbar wären (Abb. 4.4 C). TASK-4^{K242A} generiert bereits bei den pH-Werten 7,5 und 8,5 meßbare Ströme, die Amplitude ließ sich durch eine extrazelluläre Alkalisierung kaum steigern. Dieses Verhalten unterscheidet sich augenscheinlich von dem des TASK-4^{WT}, konnte bei den Stromamplituden von TASK-4^{K242H} aber ebenfalls beobachtet werden. Hier kam es bereits bei einem pH-Wert von 7,5 zu massiv gesteigerten Strömen, welche sich durch extrazelluläre Alkalisierung bis zu einem pH-Wert von 10,5 ebenfalls nur vergleichsweise geringfügig steigern ließen. Die erhöhten Ströme waren bei dem pK_a -Wert der Histidin-Seitenkette zu erwarten. Die pH-abhängige Aktivierung ist sowohl bei TASK-4^{K242A} als auch bei TASK-4^{K242H} im Vergleich zu TASK-4^{WT} deutlich geringer, welches sich in einer geringeren Steigung der Aktivierungskurve zeigt (Abb. 4.4 C). Der charakteristische Protonenblock bei einem neutralen pH-Wert von 7,5 ist aufgehoben. Der pH_{50} blieb jedoch bei allen untersuchten Mutationen konstant. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der Lysin-Rest an Position 242 in TASK-4 imstande ist, extrazelluläre Schwankungen des pH-Wertes zu erfassen und dadurch die Kanalfunktion zu beeinflussen. K242 konnte als pH-Sensor identifiziert werden.

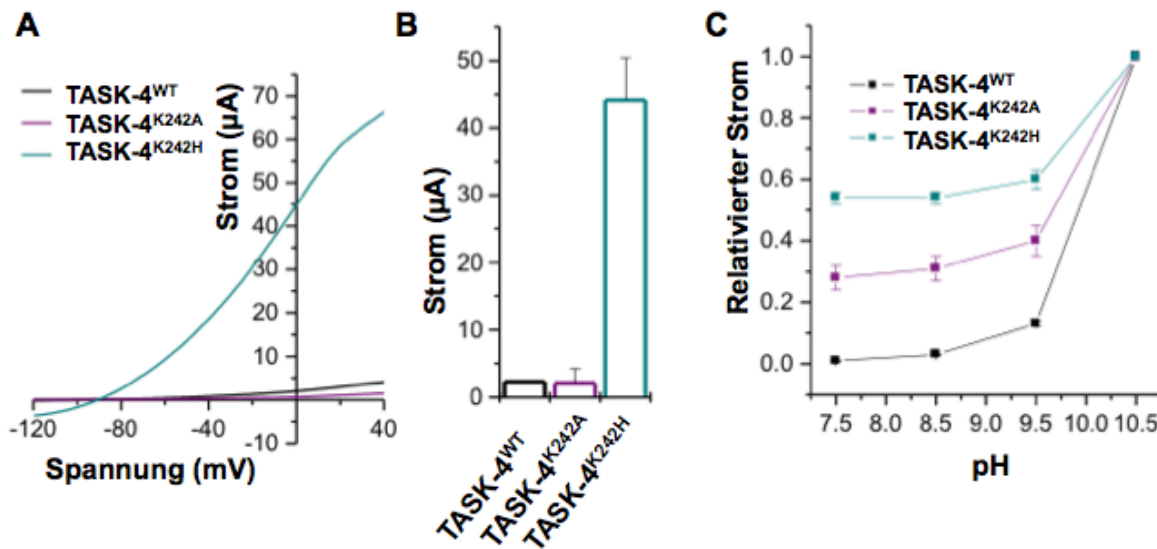


Abb. 4.4: Darstellung der Stromamplituden und deren pH-Abhängigkeit bei Mutation der Position 242 in TASK-4 Kanälen

- A Repräsentative TEVC-Messungen an *Xenopus* Oozyten bei pH 8,5 nach Injektion mit TASK-4^{WT} (schwarz) oder mutierter TASK-4^{K242A} (violett), TASK-4^{K242H} (grün) cRNA (20 ng/Oozyte). Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV erfolgte ein Spannungssprung auf -120 mV und eine Erhöhung der Spannung von -120 bis +40 mV innerhalb von 4 s. Eine Wiederholung der Spannungsrampe erfolgte alle 4 s.
- B Mittlere Stromamplituden von TASK-4^{WT} und TASK-4^{K242A} und TASK-4^{K242H} gemessen bei pH 8,5, analysiert bei 0 mV aus vier unterschiedlichen experimentellen Durchgängen. Relativierter Strom von TASK-4^{WT} ($n = 31$), TASK-4^{K242A} ($n = 9$), TASK-4^{K242H} ($n = 6$).
- C Sensibilität von TASK-4^{WT}, TASK-4^{K242A} und TASK-4^{K242H} gegenüber dem extrazellulären pH-Wert. Die Analyse der mittleren Stromamplituden erfolgte am Ende des Testpulses (Protokoll wie oben beschrieben) bei Variation des extrazellulären pH-Wertes von 7,5 bis 10,5. Die Daten wurden auf die Ströme bei einem pH-Wert von 10,5 normiert und als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Ausgehend von diesem Resultat wurde in weiteren TEVC-Experimenten untersucht, ob der beschriebene Mechanismus, welcher dem pH-Sensor K242 zu Grunde liegt, in Abhängigkeit zu dem Mechanismus steht, welcher die Stromerhöhung bei TASK-4^{G88R} bedingt. Hierzu wurden Doppelmutanten generiert, in denen sowohl die Aminosäuren an Position 242 ausgetauscht wurden als auch die Mutation G88R vorlag. Betrachtete man nun die Stromamplituden von TASK-4^{K242H} und TASK-4^{K242H/G88R} unter Modulation des pH-Wertes, zeigte sich der gleiche Effekt. Es kam bei einem neutralen pH-Wert zu einem Strom und damit zu einem Verlust des Protonenblocks. Die Ströme konnten durch extrazelluläre Alkalisierung nur geringfügig weiter aktiviert werden (Abb. 4.5 A). Diese Ergebnisse zeigten, dass die Kanalfunktion bei TASK-4^{G88R} in Bezug auf die pH-Sensitivität nicht verändert ist und der pH-Sensor K242 somit nicht kausal für die pathologische Stromerhöhung von TASK-4^{G88R} ist. Diesem Phänomen muss also ein anderer Mechanismus zu Grunde liegen.

Gestützt wird diese Annahme durch einen direkten Vergleich der Stromamplituden von TASK-4^{K242R}, nach Einführung eines Arginin-Restes an Position TASK-4^{G88R} (Abb. 4.5 B, C). Während die pH-Sensitivität bei TASK-4^{G88R} unverändert war, die Ströme sowohl durch Säure blockierbar als auch alkalisch aktivierbar waren, blieb dieser Effekt bei TASK-4^{K242R} nahezu vollständig aus. Die Stromamplituden von TASK-4^{K242R} waren, passend zu dem hohen pK_a-Wert des Arginins (12,5), fast vollständig supprimiert und traten bereits bei einem pH-Wert von 7,5 auf. Somit wurden sie nicht durch extrazelluläre Protonen blockiert. In Abbildung 4.5 D sind die relativen Ströme der G88-mutierten TASK-4 Kanäle sowie der K242-mutierten Kanäle unter Variation des extrazellulären pH-Wertes von 7,5 bis 9,5 dargestellt.

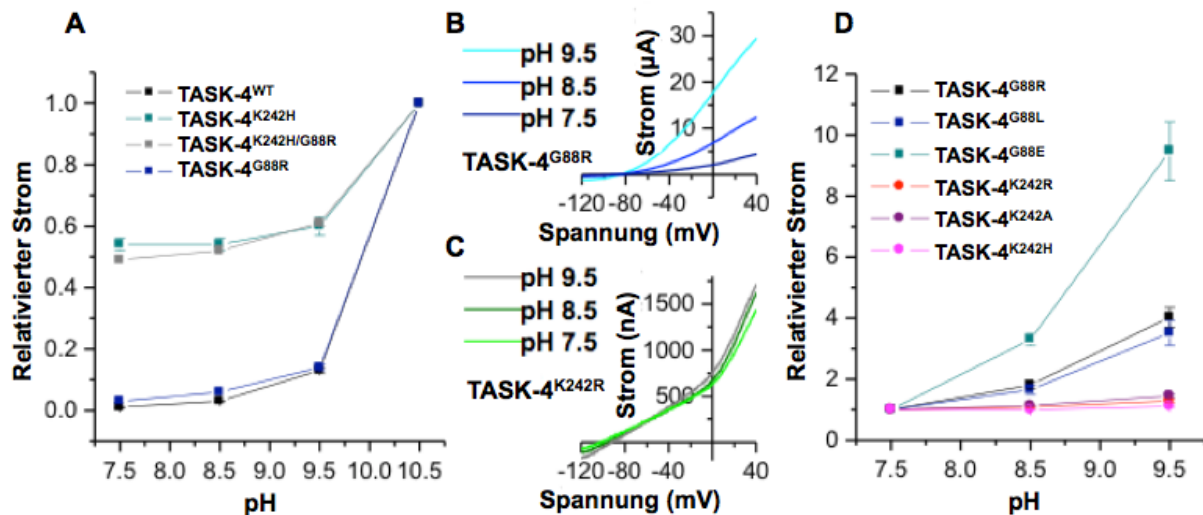


Abb. 4.5: Vergleich der Stromamplituden und deren pH-Abhängigkeit bei Mutation der Position 242 und G88R in TASK-4-Kanälen

- A Sensitivität von TASK-4^{WT} (schwarz) und mutierten TASK-4^{G88R} (blau), TASK-4^{K242H} (grün) und TASK-4^{K242H/G88R} (grau) gegenüber dem extrazellulären pH-Wert. Die Analyse der mittleren Stromamplituden erfolgte am Ende des Testpulses (Protokoll wie unten beschrieben) unter Variation des extrazellulären pH-Wertes von 7,5 bis 10,5. Die Daten wurden auf die Ströme bei einem pH von 10,5 normiert und als Mittelwert \pm SEM dargestellt.
- B Repräsentative TEVC-Messungen an *Xenopus* Oozyten nach Injektion mit TASK-4^{G88R}-Kanälen (50 nl/Oozyte) bei einem pH-Wert von 7,5, 8,5 und 9,5. Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV erfolgte ein Spannungssprung auf -120 mV und eine Erhöhung der Spannung von -120 bis +40 mV innerhalb von 4 s. Wiederholung der Spannungsrampe alle 4 s.
- C Repräsentative TEVC-Messungen an *Xenopus* Oozyten nach Injektion mit TASK-4^{K242R}-mutierten Kanälen (50 nl/Oozyte) bei einem pH-Wert von 7,5, 8,5 und 9,5 (Messprotokoll wie oben beschrieben).
- D Sensitivität von TASK-4^{WT} und mutierten TASK-4^{G88R}, TASK-4^{G88L}, TASK-4^{G88E}, TASK-4^{K242R}, TASK-4^{K242A}, TASK-4^{K242H} gegenüber dem extrazellulären pH-Wert. Die Analyse der mittleren Stromamplituden erfolgte am Ende des Testpulses (Protokoll wie oben beschrieben) unter Variation des extrazellulären pH-Wertes von pH 7,5 bis 9,5. Die Daten wurden auf die Ströme bei einem pH-Wert von 7,5 normiert und als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Um den Effekt im Bereich des alkalischen pH-Wert-Spektrums zu verdeutlichen, wurden die Daten bei einem pH von 7,5 normiert. Diese Darstellung verdeutlicht, dass die Aktivierung durch extrazellulären Anstieg des pH-Wertes bei K242-mutierten Kanälen im Vergleich zu G88-mutierten TASK-4 Kanälen verringert ist. Auch die mögliche Modulation der pH-Sensitivität durch Einfügen des Histidin-Restes an Position 242, welche sich in deutlich erhöhten Stromamplituden, aber einer herabgesetzten, grundsätzlich erhaltenen, pH-Sensitivität zeigt, wird hier noch einmal klar.

Diese Ergebnisse bekräftigen die Hypothese aus den vorangegangenen TEVC-Untersuchungen, welche bereits vermuten ließen, dass die Sensitivität von G88-mutierten TASK-4 Kanälen für extrazelluläre pH-Wert-Schwankungen nicht verändert ist. Somit stellt sie keine Grundlage für den Mechanismus der pathologischen Stromerhöhung von TASK-4^{G88R} dar.

4.1.3. Vergleich der Einzelkanalparameter von TASK-4^{WT} und TASK-4^{G88R}

In den nachfolgenden elektrophysiologischen Untersuchungen wurde sowohl TASK-4^{WT} als auch die Mutante TASK-4^{G88R} auf Einzelkanalebene charakterisiert. Die Experimente wurden mit der Patch-Clamp-Methode in der Modifikation „*Inside out*“ (siehe auch Kapitel „Material und Methoden“) durchgeführt. Diese spezielle Methodik bietet neben der Veränderung des extrazellulären pH-Wertes über die Pipetten-Lösung, die Möglichkeit der kontrollierten Untersuchung von intrazellulärer Seite über die Badlösung, welche nach Exzision des Membran-Patches das Zytoplasma ersetzt. Dies ermöglicht die Abhängigkeit des Ionenkanals von der Zusammensetzung des Zytosols zu untersuchen und war wichtig, um anhand der Parameter aus den Einzelkanalmessungen beurteilen zu können, ob der gesuchte Mechanismus zu einem veränderten Gating führt.

Bei einem extrazellulären pH-Wert von 7,5 waren, wie für TASK-4 zu erwarten, geringe Ströme messbar (Decher *et al.*, 2001). Die Spannung wurde nun in einem Bereich von -140 mV bis +140 mV in Form von Spannungspulsen um jeweils 20 mV ausgehend vom Haltepotential erhöht. Abbildung 4.6 zeigt eine repräsentative Einzelkanalmessung von TASK-4^{WT} sowie von TASK-4^{G88R} bei einem Membranpotential von -140 mV. Die durchschnittliche Stromamplitude von TASK-4^{G88R} ist mit $8,73 \pm 0,69$ pA im Vergleich zu der von TASK-4^{WT}, mit $4,77 \pm 0,18$ pA, um den Faktor 1,8 gesteigert.

Die Ergebnisse aus den Patch-Clamp-Untersuchungen zeigen, dass die Stromamplitude bei TASK-4^{G88R} auch auf Einzelkanalebene deutlich erhöht ist.

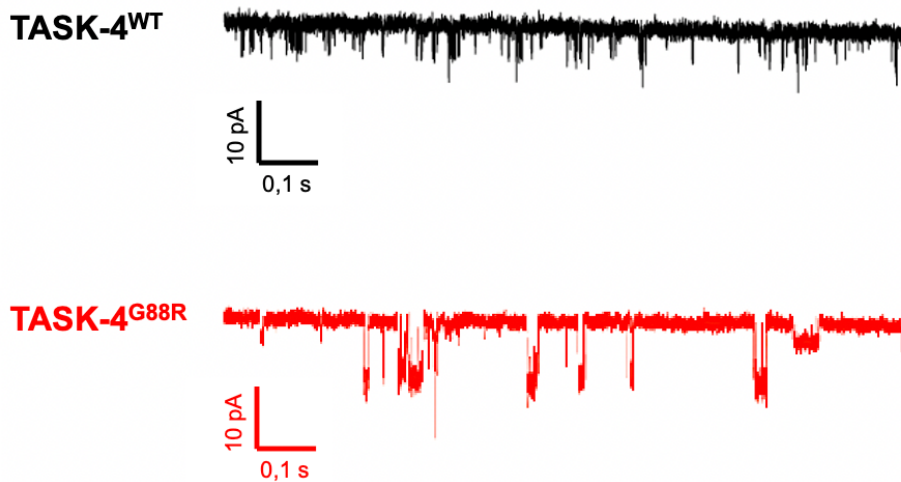


Abb. 4.6: Repräsentative Einzelkanal-Ströme von TASK-4^{WT} und TASK-4^{G88R}

Messungen der Einzelkanal-Ströme an „Inside-out“ Patches von *Xenopus* Oozyten nach Injektion mit TASK-4^{WT} bzw. TASK-4^{G88R} cRNA (4 ng/Oozyte).

Zur weiteren Verdeutlichung wurden in Abbildung 4.7 die Einzelkanal-Ströme des TASK-4^{WT} sowie TASK-4^{G88R} bei verschiedenen Potentialen in einem Strom-Spannungsdiagramm dargestellt.

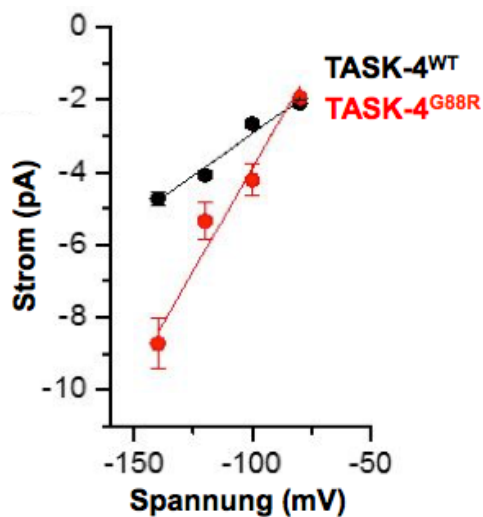


Abb. 4.7: Die Strom-Spannungsbeziehung von TASK-4^{WT} und TASK-4^{G88R} auf Einzelkanalebene

Aufgetragen ist die Stromstärke in pA auf der Y-Achse gegen die Spannung in mV auf der X-Achse. Die Einzelkanal-Messwerte von TASK-4^{WT} sind in schwarz, von TASK-4^{G88R} in rot dargestellt.

Die Steigung der Kurve entspricht der jeweiligen Einzelkanal-Leitfähigkeit. Es lässt sich aus dem Diagramm schließen, dass die Leitfähigkeit von TASK-4^{G88R} im Vergleich zu TASK-4^{WT} erhöht ist, die lineare Steigung ist deutlich steiler. Die Einzelkanal-Leitfähigkeit beträgt 113 pS bei -140 mV für TASK-4^{G88R} und 46 pS bei -140 mV für den TASK-4^{WT}-Kanal und war somit um den Faktor 2,5 gesteigert.

Dass TASK-4^{G88R} auf Einzelkanalebene eine erhöhte Leitfähigkeit aufweist ist ein weiteres wichtiges Indiz dafür, dass der zugrunde liegende Mechanismus vermutlich am ehesten mit einem veränderten Gating verbunden ist.

5. DISKUSSION

Eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit war es herauszufinden, welcher molekulare Mechanismus der funktionssteigernden Mutation TASK-4^{G88R} zugrunde liegen könnte. Zunächst konnte verifiziert werden, dass der bereits als pH-Sensor postulierte Lysin-Rest an Position 242 als solcher fungiert. Jedoch war die pH-Sensitivität von TASK-4^{G88R} unverändert. Eine detaillierte elektrophysiologische Charakterisierung mittels der TEVC-Methode ergab hingegen, dass die Hydrophobizität des Aminosäurerestes an Position 88 essentiell für die Kanalfunktion ist, und den ursächlichen Mechanismus der Funktionssteigerung von TASK-4^{G88R} bilden könnte. Durch die Mutation kommt es zu einem Austausch der Aminosäure Glyzin>Arginin an Position 88. Arginin ist im Gegensatz zu Glyzin eine stark hydrophile Aminosäure. Mit steigender Hydrophilizität der jeweiligen Aminosäure kam es in den TEVC-Messungen zu einer gesteigerten Stromamplitude. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Aminosäuren mit stark hydrophilen Eigenschaften am Selektivitätsfilter von TASK-4^{G88R} über die Ausbildung eines elektrostatischen Effektes zu einer veränderten Kanalregulation führen könnten. Ergebnisse aus Ableitungen auf Einzelkanalebene mittels der Patch-Clamp-Methode untermauern diese These, hier zeigte sich eine deutlich erhöhte Einzelkanal-Leitfähigkeit von TASK-4^{G88R} im Vergleich zum TASK-4^{WT}. Im folgenden Abschnitt sollen die oben beschriebenen Ergebnisse in den aktuellen Stand der Forschung eingeordnet und deren Relevanz anhand verschiedener bestehender Hypothesen diskutiert werden:

Der Lysin-Rest an Position 242 (K242) wurde bereits 2007 von Niemeyer *et al.* als möglicher extrazellulärer pH-Sensor von TASK-4 in Erwägung gezogen. In weitergehenden Studien von Niemeyer *et al.* (2010) stellte sich außerdem heraus, dass die Regulation von TASK-2- und TASK-4-Strömen nicht nur von dem extrazellulären (pH_o), sondern auch von dem intrazellulären pH-Wert (pH_i) abhängig war und brachte so weiterführende Erkenntnisse hinsichtlich eines möglichen Gating-Mechanismus. Die Autoren hielten es für wahrscheinlich, dass die Ströme hinsichtlich pH_o und pH_i durch verschiedene Gating-Mechanismen unabhängig voneinander kontrolliert werden. War TASK-2 durch Anstieg der extrazellulären H⁺-Konzentration inaktiviert, blieb dieser Zustand auch nach einer intrazellulären Alkalisierung bestehen. Demnach lag es nahe, dass der pH_o durch ein äußeres Gate am Selektivitätsfilter kontrolliert wird, der pH_i hingegen durch ein inneres Gate. Die Regulation für den pH_o war spannungsabhängig, jene für den pH_i hingegen nicht. Interessanterweise wurde die Regulation durch den pH_o auch von der extrazellulären

K⁺-Konzentration beeinflusst. Erhöhte man diese, wurde ein vollständiger Protonenblock verhindert. Der pH_i jedoch zeigte keine Abhängigkeit von der extrazellulären K⁺-Konzentration. Hoshi *et al.* untersuchten bereits 1990 spannungsabhängige *Shaker* Kaliumkanäle aus dem genetischen Material von *Drosophila melanogaster* hinsichtlich eines Gating-Mechanismus. Eine zytoplasmatische Domäne in der Nähe des Amino-Terminus hatte hier grundlegenden Einfluss auf die Inaktivierung der Kanäle. Der *Shaker* Amino-Terminus beinhaltet eine streng konservierte Sequenz von hydrophoben Aminosäureresten. Da sich neben der hydrophoben Aminosäure-Sequenz auch eine Sequenz von positiv geladenen und hydrophilen Aminosäureresten befand, entstand die Idee, dass sowohl hydrophobe als auch elektrostatische Aminosäureinteraktionen am Selektivitätsfilter für die Kanalfunktion essentiell sein könnten (Hoshi *et al.*, 1990). Weitere Studien zeigten auf, dass Vorgänge an der Kanalpore die sogenannte „C-Typ-Inaktivierung“ beeinflussten (López-Barneo *et al.*, 1993; Levy & Deutsch, 1996). Durch Erhöhung der extrazellulären K⁺-Konzentration kam es zu einer Verlangsamung in der Inaktivierungs-Kinetik, die Stromamplitude erhöhte sich trotz gleichzeitiger Verringerung der Triebkraft für K⁺. Dieser Effekt konnte durch den Einsatz vom Rb⁺ imitiert werden. Es schien somit eine Interaktion zwischen Kationen, speziell K⁺-Ionen und Aminosäureresten an der Außenseite der Kanalpore zu geben. Außerdem konnten die Ergebnisse zeigen, dass die ionische Zusammensetzung des extrazellulären Milieus die Kinetik der Stromamplituden beeinflusste und konnten darüber hinaus verdeutlichen, dass über die extrazelluläre K⁺-Konzentration eine physiologische Autoregulation von Kaliumkanälen erfolgen könnte (López-Barneo *et al.*, 1993; Levy & Deutsch, 1996). Anschließende Charakterisierungen von Konformationsänderungen im Selektivitätsfilter ergaben, dass die Kanalpore im Zuge der Inaktivierung sogar stärker selektiv für Na⁺ als für K⁺ wurde, darüber die Kanalfunktion selbst steuerte und letztendlich in der Lage war den Mechanismus eigenständig vermitteln zu können (Kiss *et al.*, 1999).

Ob dieser Mechanismus in K_{2P}-Kanälen vorkommt ist noch ungeklärt, aber es gibt interessante Parallelen in Bezug auf die verschiedenen diskutierten Gating-Mechanismen von K_{2P}-Kanälen, die hier näher beleuchtet werden sollen und Aufschluss darüber bringen, welcher Gating-Mechanismus für TASK-4^{G88R} denkbar und letztendlich plausibel sein könnte. Dass der Mechanismus der C-Typ-Inaktivierung durch Konformationsänderungen in der Porenregion bei spannungsabhängigen Kaliumkanälen in sehr ähnlicher Weise auch in anderen Kaliumkanälen vorkommt, konnte durch Untersuchungen von KCNKØ-Kanälen gezeigt werden (Zilberberg *et al.*, 2001). In KCNKØ-Kanälen wurde der Ionenstrom über Vorgänge an der äußeren Kanalpore moduliert. Dies konnte aus dem direkten Zusammenhang zwischen KCNKØ-Kanalaktivität und Mutationen in der äußeren Porensequenz geschlossen werden. So war die Voraussetzung für eine normale

Kanalfunktion ein Histidin-Rest in der P1-Schleife. Extrazelluläres Kalium führte in KCNKØ-Kanälen zu gesteigerten Strömen (Zilberberg *et al.*, 2001). Ein solcher Effekt konnte bereits durch eine Reduktion der C-Typ Inaktivierung in spannungsabhängigen K⁺-Kanälen durch extrazelluläres Kalium beobachtet werden (López-Barneo *et al.*, 1993; Baukrowitz & Yellen, 1995; Ogielska & Aldrich, 1999). Da die Porenregion in spannungsabhängigen K⁺-Kanälen und KCNKØ-Kanälen strukturell und funktionell fast identisch ist, wurde diskutiert, ob ein vergleichbarer Mechanismus eine denkbare Eigenschaft von K_{2P}-Kanälen sein könnte, da die Kanalfunktion von *KCNK2* (TREK-1) und *KCNK3* (TASK-1) abhängig von extrazellulären Ionenkonzentration war (Zilberberg *et al.*, 2001).

Wie groß die Bedeutung des Selektivitätsfilters für die Kanalregulation wirklich ist, wurde erst mit Entdeckung der extrazellulären pH-Sensitivität bei einer Reihe von Mitgliedern der K_{2P}-Kanalfamilie deutlich (Kim *et al.*, 2000; Rajan *et al.*, 2000; Lopes *et al.*, 2001). Zwar war bei TASK-1 und TASK-3 bekannt, dass die pH-Sensitivität durch Protonierung und Neutralisierung von Histidin98 vermittelt wurde (Lopes *et al.*, 2000, 2001; González *et al.*, 2013), ähnlich dem Mechanismus der C-Typ-Inaktivierung, der genaue Mechanismus blieb aber unklar. Modell-Untersuchungen von Yuill *et al.* (2007), basierend auf der Struktur des KcsA-Kanals, gaben erstmals Aufschluß darüber, dass der pH-Sensor (Histidin98) hinter dem Selektivitätsfilter lokalisiert ist und dessen Protonierung zu einer möglichen Veränderung der Form des Selektivitätsfilters führte und eine weitere Ionenpassage verhinderte. Eine Mutation des pH-Sensors beeinflusste nicht nur die Ionen-Selektivität sondern auch die pH-Abhängigkeit. Dies passte zu der Idee eines Gating-Mechanismus, welcher über den Selektivitätsfilter vermittelt wird.

Darauffolgende Studien durch Stansfeld *et al.* (2008) zeigten, dass die Protonierung von Histidin98 zu einem „flipping“ des pH-Sensors über eine Konformationsänderung des Selektivitätsfilters zu einer Regulation des K⁺-Stromes führte, da hierdurch eine elektropositive Barriere für K⁺-Ionen an der äußeren Öffnung der Kanalpore entstanden war. Dies war besonders deshalb von Interesse, weil diese Erkenntnisse eine Verbindung zwischen der pH-Sensitivität der Kanäle und der beschriebenen K⁺-Abhängigkeit herstellten.

Wichtig waren hier weiterführend die Ergebnisse hinsichtlich des extrazellulären Ionen-Passageweges (EIP), welcher von González *et al.* (2013) bei TASK-3 auf Basis von kristallinen Modellen der K_{2P}-Kanäle TRAAK und TWIK-1 beschrieben wurde. TASK-3-Ströme wurden, genau wie jene von TASK-4, durch Anstieg der extrazellulären H⁺-Konzentration blockiert. Die Seitenportale des EIP könnten eine kontrollierte Regulation der Kanalpore als Reaktion auf Änderungen des extrazellulären pH-Wertes im Sinne eines eigenen Gating-Mechanismus ermöglichen. Nach den Ergebnissen der Autoren war die K⁺-Konzentration innerhalb dieser

Passagewege von determinierender Relevanz für die pH-Abhängigkeit und den kooperativen Gating-Prozess bei TASK-3. Die negativ geladenen Glutamat-Seitenketten als Bestandteil der Wand des EIP und nahe am pH-Sensor lokalisiert, beeinflussten zudem das elektrostatische Potential im Passageweg. Die Aminosäurereste waren damit ein wichtiger determinierender Faktor für die Höhe der K^+ -Konzentration im EIP und hatten Auswirkung auf die Besetzung der K^+ -Bindungsstellen im Selektivitätsfilter (González *et al.*, 2013). Erste Erkenntnisse in Bezug auf die Existenz eines hydrophoben Gates bei K_{2P} -Kanälen konnten aus einer molekulardynamischen Simulation der kristallinen Struktur von TWIK-1, eingebettet in einen Phospholipid-Bilayer, gewonnen werden. Zwei Leuzin-Reste in TM2 und -4 kleiden die Pore in Form einer Manschette aus und könnten durch Ausbildung eines hydrophoben Umfeldes eine energetische Barriere für durchfließende Ionen schaffen. Whole-Cell-Messungen an mutierten TWIK-1-Kanälen zeigten massiv gesteigerte Ionenströme. Für eine Validierung der Ergebnisse wurde eine Kalkulation der freien Energie durchgeführt, welche eine energetische Barriere für den Ionenfluss bei dem Wildtyp, nicht aber bei den Mutanten zeigte. Funktionelle Untersuchungen ergaben zudem, dass eine Reihe von hydrophilen, aber nicht hydrophoben Interaktionen innerhalb der genannten Manschette die hydrophobe Barriere durchbrechen und damit die massive Erhöhung des Ionenstromes ermöglichen (Aryal *et al.*, 2014).

TASK-4 beinhaltet in der molekularen Struktur einen Lysin-Rest an Position 242 (K242) als pH-Sensor. Niemeyer *et al.* (2007) untersuchten das nähere Aminosäureumfeld des Arginin-Restes an Position 224 (R224) in TASK-2 am strukturellen Modell des K^+ -Kanales $K_v1.2$, welcher bei TASK-2 als pH-Sensor fungiert. R224 ist in der α -Helix von TM4 nahe dem Selektivitätsfilter lokalisiert und wird in seiner Position durch ein hydrophobes Gerüst stabilisiert, welches maßgeblich über einen nahegelegenen Isoleuzin-Rest an Position 90 (I90) vermittelt wird. In direkter Nähe befindet sich ein Asparagin-Rest an Position 87 (N87) in der Helix von P1, mit dem R224 lediglich über Wasserstoffbrückenbindungen verbunden ist sowie ein weiterer Asparagin-Rest an Position 103 (N103) von P1 im Bereich des Selektivitätsfilters. Niemeyer *et al.* untersuchten hiernach auch den Selektivitätsfilter von TASK-4 am strukturellen Modell des K^+ -Kanales $K_v1.2$. Der pH-Sensor K242 von TASK-4 ist an äquivalenter Stelle in der α -Helix von TM4 lokalisiert wie R224 bei TASK-2, und scheint durch Wasserstoffbrückenbindungen mit N103 verbunden zu sein. Bei TASK-4 nimmt ein Phenylalanin-Rest an Position 108 (F108) den Platz von I90 ein. Da es sich bei Phenylalanin um eine aromatische Aminosäure handelt, die über π -Elektronen ein hydrophobes, elektrostatisches Umfeld schaffen kann, ist es denkbar, dass bei TASK-4 eine beachtliche amino-aromatische Wechselwirkung den hohen pK_i begründet. Die Idee, dass der pH-Sensor K242 durch ein hydrophobes, elektrostatisches Umfeld stabilisiert wird, ist deshalb besonders interessant, weil

bei TASK-4^{G88R} die Hydrophobizität der Aminosäure an Position 88 entscheidend für eine normale Kanalfunktion ist und die hydrophile Eigenschaft des Arginin-Rests an Position 88 die gesuchte Schlüsseleigenschaft für die veränderte Kanalfunktion darstellen könnte. Zwar wurde die pH-Abhängigkeit durch die Mutation nicht beeinflusst, die Intensität des Ionenstromes jedoch durchaus. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Korrelation zwischen der Hydrophobizität des Aminosäurerestes an der Position 88 und der Intensität des Ionenstromes.

Einen weiterführenden Ansatzpunkt hierzu bilden die Untersuchungen eines hydrophilen Gating-Mechanismus von Aryal *et al.* (2014). Die Basis dieser denkbaren Form der Regulation stammte aus Studien molekulardynamischer Simulationsmodelle von Carbon-Nanotunneln (Hummer *et al.*, 2001; Beckstein *et al.*, 2001). Das Prinzip beruhte auf dem Verhalten von Wasserströmen in engen, hydrophoben Poren. Aufgrund der gegenseitigen Abstoßungsreaktion der Wassermoleküle und der hydrophoben inneren Oberfläche der Pore kam es zu Schwankungen im Gas-Flüssigkeitsverhältnis, die ermöglichten, dass die Pore in einen transienten „trockenen“ oder „wässrigen“ Status übergehen konnte (Beckstein *et al.*, 2003; Allen *et al.*, 2003). Im „trockenen“ Zustand war die Pore ganz oder vollständig frei von Wassermolekülen, was wiederum eine hoch effektive energetische Barriere für den Ionenstrom darstellte (Beckstein *et al.*, 2004). Die Studien sind deshalb so interessant, weil die innere Struktur der Poren von Ionenkanälen jenen Bereichen im Modell der Nanopore ähnelt, in welchen der hydrophobe Gating-Mechanismus beobachtet werden konnte, und sowohl die bestehenden Ansätze hinsichtlich einer möglichen Kanalregulation über eine Verringerung des Porendurchmessers als auch durch hydrophile Interaktionen am Selektivitätsfilter stützen. Die Nanotunnel-Studien zeigten zudem, dass die Hydrierung einer funktionell geschlossenen hydrophoben Nanopore auch durch eine Applikation von Spannung erreicht werden kann. Dies ist die funktionelle Schlüsseleigenschaft eines hydrophoben Gates (Dzubiella *et al.*, 2004). Nachfolgende Analysen von Guo *et al.* (2013) belegten, dass eine einfache Veränderung der Porenform zu einem asymmetrischen Ionenfluss, im Sinne einer Rektifizierung, führte. Die Hypothese eines hydrophoben Gates wäre auch für den Mechanismus der Funktionssteigerung bei TASK-4^{G88R} plausibel.

Ein alternativer, spannungsabhängiger, Ionen-vermittelter Gating-Mechanismus für K_{2P}-Kanäle wurde 2016 durch Schewe *et al.* publiziert, welcher durch die einzigartige funktionelle Plastizität des Selektivitätsfilters ermöglicht werden soll. Die spannungsabhängige Regulation stellt demnach eine signifikante Komponente in der Auswärtsrektifizierung dieser Kanalgruppe dar. K_{2P}-Kanäle besitzen, wie erwähnt, keinen konventionellen Spannungssensor, der diesen Mechanismus

vermitteln könnte. Mit Ausnahme von TWIK-1 konnte für alle K_{2P} -Kanäle, auch für TASK-4, eine Spannungsabhängigkeit gezeigt werden, welche auf dem Durchtritt von Ionen selbst und der damit verbundenen elektrochemischen Potentialdifferenz beruht. Demnach ist die Spannungsabhängigkeit die Konsequenz der Permeation von Ionen nach über das Spannungsgefälle der Membran, welches sich entlang des Selektivitätsfilters ausbildet. Bei negativen Potentialen ist der Selektivitätsfilter der Hypothese nach leer und inaktiv. Im Zuge der Depolarisation strömen demnach Ionen in den Selektivitätsfilter, welcher, wenn dessen Bindungsstellen vollständig besetzt sind, durchgängig für einen K^+ -Auswärtsstrom wird. Eine vollständige Besetzung der Bindungsstellen kann demnach jedoch nicht durch einen Ionen-Einwärtsstrom erreicht werden, hier geht der Filter in einen inaktiven Zustand über, im Sinne eines Rückschlagventils (sogenannter „One-Way Valve“ Mechanismus). Zwar konnten in den Einzelkanal-Untersuchungen dieser Arbeit bei einem Membranpotential von +140 mV ebenfalls große Auswärtsströme beobachtet werden, jedoch traten bei -140 mV ebenso prominente Einwärtsströme auf. Zudem konnten die Messungen zeigen, dass der Stromerhöhung bei der TASK-4^{G88R} Mutation eine erhöhte Einzelkanal-Leitfähigkeit zugrunde liegt. Diesen Ergebnissen nach funktioniert der Mechanismus des Ion-Flux-Gating bei TASK-4 sowohl nach intra- als auch nach extrazellulär und nicht nur in der zuvor postulierten unidirektionalen Richtung.

Aktuellste Ergebnisse aus röntgen-kristallographische Modellstudien von TASK-1 von Rödström *et al.* (2020) brachten bezüglich eines möglichen Mechanismus deutlichen Aufschluss. Die Autoren konnten anhand des Modells in K_{2P} -Kanälen erstmals ein unteres Gate, das sogenannte „X-Gate“ nachweisen, welches durch eine Interaktion der zwei gekreuzten C-terminalen M4-Transmembransegmenten am Eingang des Vestibulums und aus sechs Aminosäure-Resten (²⁴³VLR²⁴⁸FM²⁴⁸T) besteht. Die helikale Struktur des Gates ist von hydrophoben Aminosäure-Resten gesäumt, die den Ionenstrom blockieren. Dem X-Gate geht zudem eine Art Scharnier aus einem Leuzin- und Valin-Rest voraus. Der Leuzin-Rest stabilisiert das Gate durch eine hydrophobe Interaktion in seiner Konformation, indem er Wasserstoffbrückenbindungen mit dem nahegelegenen Arginin-Rest (245) innerhalb der Gate-Sequenz bildet. Mutationen des Leuzin- oder Arginin-Restes durch Einführen eines Alanin-Restes führte zu 5-7fach erhöhten Stromamplituden. Die These eines Gating-Mechanismus durch hydrophobe/hydrophile Aminosäureinteraktionen, verbunden mit einem entsprechenden elektrostatischen Effekt, durch den die Ionenpassage moduliert wird, erscheint aufgrund der vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit als am ehesten plausibel.

5.1. Perspektive

Gegenstand nachfolgender Untersuchungen zu dieser Arbeit sollte in erster Linie ein molekulardynamisches Modell von TASK-4^{WT} und TASK-4^{G88R} sein, wie es bereits von Gonzalez *et al.* für TASK-3, von Niemeyer *et al.* für TASK-2 und Rödström *et al.* für TASK-1 verwendet wurde. Hier könnte ebenfalls ein Modell auf Basis der gut untersuchten kristallinen Struktur von TASK-1 erstellt werden. Anhand dessen könnte man Aufschluss darüber gewinnen, welche Aminosäureinteraktionen am Selektivitätsfilter genau stattfinden und wie diese im Detail den Durchtritt von Ionen beeinflussen können. Hierzu wäre ergänzend sicherlich noch eine Kalkulation der energetischen Schwankungen im EIP sinnvoll.

Zudem wäre von Interesse, ob mögliche Interaktionen zu einer Konformationsänderung des Selektivitätsfilters führen oder ob ein anderer molekularer Mechanismus dem Gating zu Grunde liegt. Darüber hinaus bleibt weiter die Frage offen, worin genau die veränderte Leitfähigkeit von TASK-4^{G88R} begründet ist. Hierzu wäre es sinnvoll, die entsprechende homologe Position von TASK-4^{G88R} in dem molekulardynamischen Modell von TASK-1 zu mutieren (TASK-1^{G88R}), um den Phänotyp so zu reproduzieren und elektrophysiologisch untersuchen zu können.

Des Weiteren wäre eine wichtige Frage, ob extrazelluläre Kationen den Ionenstrom modulieren können. Hier wären Untersuchungen sowohl von TASK-4 als auch TASK-4^{G88R} unter Einfluss von Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺ und Na⁺ aufschlussreich. Dabei könnte sich auch zeigen, ob eine entsprechende Modulation des Ionenstromes eventuell durch die TASK-4^{G88R} Mutation zusätzlich, beispielsweise in Form eines erleichterten Gatings, beeinflusst wi

6. ZUSAMMENFASSUNG

6.1. Zusammenfassung

Mutationen in Zwei-Porendomänen Kalium (K_{2P}) -Kanälen konnten bereits mit verschiedenen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden. Dazu zählt beispielsweise die dominant-negative Mutation im TRESK-Kanal (*KCNK18*), welche mit einer Form von familiärer Migräne mit Aura assoziiert ist (Lafrenière *et al.*, 2010). Eine Mutation im TASK-3-Kanal (*KCNK9*) kann zu dem Birk Barel Syndrom mit mentaler Retardierung führen (Barel *et al.*, 2008). Eine hereditäre pulmonale Hypertension kann durch verschiedene TASK-1 (*KCNK3*) Mutationen verursacht sein, die einen Funktionsverlust des Kanals verursachen (Ma *et al.*, 2013). Eine heterozygote Punktmutation im Selektivitätsfilter des TREK-1-Kanals (*KCNK2*) kann ursächlich für eine RVOT-Tachykardie (Tachykardie aus dem rechten ventrikulären Ausflusstrakt; right ventricular outflow tract = RVOT) sein. Die Mutation führt bei TREK-1 zu einer erhöhten Na^+ -Permeabilität und einer gesteigerten Aktivierung durch eine erhöhte Sensibilität für mechanische Dehnung (Decher *et al.*, 2017). In dem pH-sensitiven K_{2P} -Kanal TASK-4 (*KCNK17*) konnte 2014 durch Friedrich *et al.* eine Genmutation identifiziert werden, welche ebenfalls eine krankheitsauslösende Rolle bei Arrhythmien spielt. In dieser Studie war die Grundlage für die genetischen Untersuchungen der Phänotyp einer progressiven kardialen Reizleitungsstörung (progressive cardiac conduction disorder = PCCD) in Kombination mit einem idiopathischen Kammerflimmern. Die hierbei identifizierte Mutation, TASK-4^{G88R}, verursachte eine erhebliche Funktionssteigerung des Kanals. Bei demselben Patienten konnte neben der Mutation im TASK-4-Kanal eine Mutation im prädisponierenden *SCN5A*-Gen identifiziert werden, welches für den spannungsabhängigen Natriumkanal $Na_v1.5$ kodiert. Eine Mutation in der gleichen Spleißstelle, welche zum Überspringen eines Exons führte, wurde bereits zuvor von Probst *et al.* (2003) im Rahmen von Untersuchungen von Mitgliedern einer französischen Familie, in welcher eine kardiale Reizleitungsstörung autosomal-dominant vererbt wurde, als krankheitsauslösend beschrieben. In den „whole cell“ Patch-Clamp-Messungen zeigte sich hier ein Funktionsverlust des $Na_v1.5$ -Kanals, welcher zu einer herabgesetzten Reizleitungsgeschwindigkeit führte. Die Kombination aus diesem Funktionsverlust des $Na_v1.5$ -Kanals und einer verstärkten Hyperpolarisation von Zellen des Reizleitungssystems durch die TASK-4^{G88R} Funktionsgewinn-Mutation könnte die Reizleitung in diesen Patienten noch einmal zusätzlich verlangsamen und den ungewöhnlichen Phänotyp aus Kammerflimmern und PCCD erklären (Friedrich *et al.*, 2014).

Der molekulare Mechanismus, welcher der veränderten Kanalfunktion von TASK-4^{G88R} zu Grunde liegt, blieb ungeklärt. Das Ziel dieser Arbeit war es, diesen Mechanismus weitergehend zu untersuchen.

Zu diesem Zwecke wurden elektrophysiologische Experimente an *Xenopus laevis* Oozyten mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme durchgeführt. Messungen der Ionenströme, nach systematischer Einführung aller 20 verschiedenen natürlichen Aminosäuren an Position 88 im TASK-4-Protein durch positionsgerichtete Mutagenese, ergaben, dass eine normale Kanalfunktion vermutlich über die Hydrophobizität des an dieser Position lokalisierten Aminosäurerestes vermittelt wird.

Ein weiterer wichtiger Fokus war die Frage, ob die pH-Sensitivität des TASK-4-Kanals ebenfalls durch die Aminosäure an Position 88 beeinflusst wird. Anhand vorheriger elektrophysiologischer Untersuchungen von Niemeyer *et al.* (2007) wurde postuliert, dass ein Lysin-Rest an Position 242, in unmittelbarer Nähe der Kanalpore gelegen, als pH-Sensor von TASK-4 fungieren könnte. Eine Neutralisierung von K242 führte zu erhöhten Stromamplituden bei einem neutralen pH-Wert im Vergleich zum TASK-4^{WT}. G88 befindet sich direkt oberhalb des Selektivitätsfilters, also in unmittelbarer Nähe zum pH-Sensor. In dieser Arbeit konnte ich bestätigen, dass der Lysin-Rest an Position 242 zwar die pH-Sensitivität vermittelt, jedoch nicht in Zusammenhang mit dem Mechanismus steht, der die Funktionssteigerung in TASK-4^{G88R} begründet. Dies konnte anhand von Doppelmutationen gezeigt werden, in denen sowohl die Aminosäure an Position 242 als auch an Position 88 ausgetauscht wurde. Ableitungen auf Einzelkanalebene mittels der Patch-Clamp-Technik zeigten eine erhöhte Einzelkanal-Leitfähigkeit von TASK-4^{G88R}. Eine Hypothese für den kausalen Mechanismus ist eine komplexe Aminosäure-Interaktion des hydrophilen Arginin-Restes an Position 88 mit Aminosäuren des nahe gelegenen Selektivitätsfilters. Eine solche Interaktion könnte durch die Ausbildung einer „hydrophilen Wolke“ einen starken elektrostatischen Effekt erzielen und so die Ionenpermeation gezielt regulieren.

6.2. Summary

A variety of mutations in two-pore domain potassium (K_{2P})-channels have been linked to various diseases. Examples include the dominant-negative mutation in the TRESK channel (*KCNK18*), which is associated with a form of familial migraine with aura (Lafrenière *et al.*, 2010) and a mutation in the TASK-3 channel (*KCNK9*) leading to Birk Barel syndrome with mental retardation (Barel *et al.*, 2008). Hereditary pulmonary hypertension can be caused by various loss of function mutations in the TASK-1 channel (*KCNK3*) (Ma *et al.*, 2013). A tachycardia of the right ventricular outflow tract (RVOT) can be caused by a heterozygous point mutation in the selectivity filter sequence of the TREK-1 channel (*KCNK2*), which leads to an increased sodium permeability and stretch-sensitivity (Decher *et al.*, 2017). In 2014, Friedrich *et al.* identified a novel mutation in the pH-sensitive K_{2P} -channel TASK-4 (*KCNK17*) in a patient with a progressive cardiac conduction disorder (PCCD) in combination with idiopathic ventricular fibrillation. This TASK-4^{G88R} mutation causes a significant gain of function. Interestingly, in the same patient, an additional mutation in the predisposing *SCN5A* gene was identified, which codes for the voltage-dependent sodium channel $Na_v1.5$. Probst *et al.* (2003) previously described a disease-causing mutation affecting the same splice site, which resulted in an exon skipping, in several members of a French family with an autosomal-dominant cardiac conduction disorder. Data from "whole cell" patch-clamp measurements showed a loss of function of the $Na_v1.5$ -channel leading to a lengthening of conduction times. Therefore, the combination of the loss of function mutation in the $Na_v1.5$ channel and the increased cellular hyperpolarization due to the TASK-4^{G88R} mutation in the same patient may exert additive effects slowing down cardiac conductivity. This could explain the unusual phenotype of ventricular fibrillation and PCCD (Friedrich *et al.*, 2014). The molecular mechanism underlying the altered channel function of TASK-4^{G88R} has not been clarified yet. The main focus of this thesis was to further investigate this mechanism. For this purpose, electrophysiological experiments were carried out on *Xenopus laevis* oocytes using the two-electrode voltage clamp. Measurements of the ion currents after systematic introduction of all 20 different natural amino acids at position 88 in the TASK-4 protein by position-directed mutagenesis showed that normal channel function is probably mediated by the hydrophobicity of the amino acid residue located at this position. Another important focus was the question of whether the pH-sensitivity of TASK-4 is influenced by the amino acid at position 88. Based on previous electrophysiological investigations by Niemeyer *et al.* (2007), who postulated, that a lysine residue at position 242, located in the immediate vicinity of the channel pore, could act as the pH sensor of TASK-4. A neutralization of K242 resulted in increased current amplitudes at a neutral

pH-value compared to the TASK-4^{WT}. G88 is located directly above the selectivity filter, in the immediate vicinity of the pH sensor. In this study, I provide evidence, that the lysine residue at position 242 mediates the pH-sensitivity, but this is not related to the additional gain of function mechanism due to TASK-4^{G88R} mutation. This could be shown by double mutations in which both the amino acid at position 242 and at position 88 were exchanged. Investigations on single-channel level using patch clamp showed an increased single-channel conductance of TASK-4^{G88R}. Finally, I hypothesize a complex interaction of the hydrophilic arginine residue at position 88 with amino acids of the selectivity filter nearby. Such an interaction could achieve a strong electrostatic effect through the formation of a "hydrophilic cloud" and thus regulate the ion permeation in a targeted manner.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Afzali, A. M., Ruck, T., Herrmann, A. M., Iking, J., Sommer, C., Kleinschnitz, C., et al. (2016). The potassium channels TASK2 and TREK1 regulate functional differentiation of murine skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 311(4), C583-C595.
- Allen R, Hansen JP, Melchionna S. (2003) Molecular dynamics investigation of water permeation through nanopores. *Journal of Chemical Physics*, 119:3905–3919.
- Aryal, P., Abd-Wahab, F., Bucci, G., Sansom, M. S., & Tucker, S. J. (2014). A hydrophobic barrier deep within the inner pore of the TWIK-1 K2P potassium channel. *Nat Commun*, 5, 4377.
- Ashmole, I., Goodwin, P. A., & Stanfield, P. R. (2001). TASK-5, a novel member of the tandem pore K⁺ channel family. *Pflugers Arch*, 442(6), 828-833.
- Añazco, C., Peña-Münzenmayer, G., Araya, C., Cid, L. P., Sepúlveda, F. V., & Niemeyer, M. I. (2013). G protein modulation of K2P potassium channel TASK-2: a role of basic residues in the C terminus domain. *Pflugers Arch*, 465(12), 1715-1726.
- Barel, O., Shalev, S. A., Ofir, R., Cohen, A., Zlotogora, J., Shorer, Z., et al. (2008). Maternally inherited Birk Barel mental retardation dysmorphism syndrome caused by a mutation in the genomically imprinted potassium channel *KCNK9*. *Am J Hum Genet*, 83(2), 193-199.
- Baukrowitz, T., and Yellen, G. (1995). Modulation of K⁺ current by frequency and external [K⁺]: A tale of two inactivation mechanisms. *Neuron* 15, 951–960.
- Beckstein O, Biggin PC, Sansom MSP. (2001) A hydrophobic gating mechanism for nanopores. *J Phys Chem B*, 105:12902–12905.
- Beckstein, O., & Sansom, M. S. (2003). Liquid-vapor oscillations of water in hydrophobic nanopores. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(12), 7063-7068.
- Beckstein, O., Tai, K., & Sansom, M. S. (2004). Not ions alone: barriers to ion permeation in nanopores and channels. *J Am Chem Soc*, 126(45), 14694-14695.
- Ben-Abu, Y., Zhou, Y., Zilberberg, N., & Yifrach, O. (2009). Inverse coupling in leak and voltage-activated K⁺ channel gates underlies distinct roles in electrical signaling. *Nat Struct Mol Biol*, 16(1), 71-79.
- Berg, A. P., Talley, E. M., Manger, J. P., & Bayliss, D. A. (2004). Motoneurons express heteromeric TWIK-related acid-sensitive K⁺ (TASK) channels containing TASK-1 (*KCNK3*) and TASK-3 (*KCNK9*) subunits. *J Neurosci*, 24(30), 6693-6702.
- Bianchi, L., & Driscoll, M. (2006). Heterologous expression of *C. elegans* ion channels in *Xenopus* oocytes. *WormBook*, 1-16.

- Bittner, S., Meuth, S. G., Göbel, K., Melzer, N., Herrmann, A. M., Simon, O. J., et al. (2009). TASK1 modulates inflammation and neurodegeneration in autoimmune inflammation of the central nervous system. *Brain*, 132(Pt 9), 2501-2516
- Blin, S., Ben Soussia, I., Kim, E. J., Brau, F., Kang, D., Lesage, F., et al. (2016). Mixing and matching TREK/TRAAK subunits generate heterodimeric K_{2P} channels with unique properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Blin, S., Chatelain, F. C., Feliciangeli, S., Kang, D., Lesage, F., & Bichet, D. (2014). Tandem pore domain halothane-inhibited K⁺ channel subunits THIK1 and THIK2 assemble and form active channels. *J Biol Chem*, 289(41), 28202-28212.
- Bockenhauer, D., Zilberberg, N., & Goldstein, S. A. (2001). KCNK2: reversible conversion of a hippocampal potassium leak into a voltage-dependent channel. *Nat Neurosci*, 4(5), 486-491.
- Borsotto, M., Veyssiere, J., Moha Ou Maati, H., Devader, C., Mazella, J., & Heurteaux, C. (2015). Targeting two-pore domain K⁺ channels TREK-1 and TASK-3 for the treatment of depression: a new therapeutic concept. *Br J Pharmacol*, 172(3), 771-784.
- Brohawn, S. G., Campbell, E. B., & MacKinnon, R. (2013). Domain-swapped chain connectivity and gated membrane access in a Fab-mediated crystal of the human TRAAK K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(6), 2129-2134.
- Brohawn, S. G., del Marmol, J., & MacKinnon, R. (2012). Crystal structure of the human K2P TRAAK, a lipid- and mechano-sensitive K⁺ ion channel. *Science*, 335(6067), 436-441.
- Chatelain, F. C., Bichet, D., Feliciangeli, S., Larroque, M. M., Braud, V. M., Douguet, D., et al. (2013). Silencing of the tandem pore domain halothane-inhibited K⁺ channel 2 (THIK2) relies on combined intracellular retention and low intrinsic activity at the plasma membrane. *J Biol Chem*, 288(49), 35081-35092.
- Chavez RA, Gray AT, Zhao BB, Kindler CH, Mazurek MJ, Mehta Y, Forsayeth JR & Yost CS (1999). TWIK-2, a new weak inward rectifying member of the tandem pore domain potassium channel family. *J Biol Chem* 274, 7887–7892.
- Chemin, J., Girard, C., Duprat, F., Lesage, F., Romey, G., & Lazdunski, M. (2003). Mechanisms underlying excitatory effects of group I metabotropic glutamate receptors via inhibition of 2P domain K⁺ channels. *EMBO J*, 22(20), 5403-5411.
- Chen, H., Chatelain, F. C., & Lesage, F. (2014). Altered and dynamic ion selectivity of K⁺ channels in cell development and excitability. *Trends Pharmacol Sci*, 35(9), 461-469.
- Chen, X., Talley, E. M., Patel, N., Gomis, A., McIntire, W. E., Dong, B., et al. (2006). Inhibition of a background potassium channel by Gq protein alpha-subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(9), 3422-3427.
- Chesler, M., & Kaila, K. (1992). Modulation of pH by neuronal activity. *Trends Neurosci*, 15(10), 396-402.

- Claycomb, W. C., Lanson, N. A., Stallworth, B. S., Egeland, D. B., Delcarpio, J. B., Bahinski, A., et al. (1998). HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(6), 2979-2984.
- Czirják, G., & Enyedi, P. (2002). Formation of functional heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 two-pore domain potassium channel subunits. *J Biol Chem*, 277(7), 5426-5432.
- Czirják, G., Tóth, Z. E., & Enyedi, P. (2004). The two-pore domain K⁺ channel, TREK-1, is activated by the cytoplasmic calcium signal through calcineurin. *J Biol Chem*, 279(18), 18550-18558.
- Dascal, N. (2001). Voltage clamp recordings from *Xenopus* oocytes. *Curr Protoc Neurosci*, Chapter 6, Unit 6.12.
- Davies, L. A., Hu, C., Guagliardo, N. A., Sen, N., Chen, X., Talley, E. M., et al. (2008). TASK channel deletion in mice causes primary hyperaldosteronism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(6), 2203-2208.
- Decher, N., Kiper, A. K., Rolfes, C., Schulze-Bahr, E., & Rinné, S. (2014). The role of acid-sensitive two-pore domain potassium channels in cardiac electrophysiology: focus on arrhythmias. *Pflügers Arch*, 467(5), 1055-1067.
- Decher, N., Maier, M., Dittrich, W., Gassenhuber, J., Brüggemann, A., Busch, A. E., et al. (2001). Characterization of TASK-4, a novel member of the pH-sensitive, two-pore domain potassium channel family. *FEBS Lett*, 492(1-2), 84-89.
- Decher N, Barth AS, Gonzalez T, Steinmeyer K, Sanguinetti MC (2004) Novel KChIP2 isoforms increase functional diversity of transient outward potassium currents. *J Physiol* 557: 761 – 772
- Decher, N., Wemhöner, K., Rinné, S., Netter, M. F., Zuzarte, M., Aller, M. I., et al. (2011). Knock-out of the potassium channel TASK-1 leads to a prolonged QT interval and a disturbed QRS complex. *Cell Physiol Biochem*, 28(1), 77-86.
- Decher, N., Ortiz-Bonnin B., Friedrich, C., Schewe M., Kiper, A.K., Rinné, S. et al. (2017). Sodium permeable and "hypersensitive" TREK-1 channels cause ventricular tachycardia. *EMBO Mol Med*. 9(4), 403-414
- Dong, Y. Y., Pike, A. C., Mackenzie, A., McClenaghan, C., Aryal, P., Dong, L., et al. (2015). K2P channel gating mechanisms revealed by structures of TREK-2 and a complex with Prozac. *Science*, 347(6227), 1256-1259.
- Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., et al. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, 280(5360), 69-77.
- Duprat, F., Lesage, F., Fink, M., Reyes, R., Heurteaux, C., & Lazdunski, M. (1997). TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J*, 16(17), 5464-5471.

- Dzubiella, J., Allen, R. J., & Hansen, J. P. (2004). Electric field-controlled water permeation coupled to ion transport through a nanopore. *J Chem Phys*, 120(11), 5001-5004.
- Eisenberg, D. (1984). Three-dimensional structure of membrane and surface proteins. *Annu Rev Biochem*, 53, 595-623.
- Fatkin, D., MacRae, C., Sasaki, T., Wolff, M. R., Porcu, M., Frenneaux, M., et al. (1999). Missense mutations in the rod domain of the *lamin A/C* gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *N Engl J Med*, 341(23), 1715-1724.
- Feliciangeli, S., Chatelain, F. C., Bichet, D., & Lesage, F. (2015). The family of K_{2P} channels: salient structural and functional properties. *J Physiol*, 593(12), 2587-2603.
- Fink, M., Duprat, F., Lesage, F., Reyes, R., Romey, G., Heurteaux, C., et al. (1996). Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K⁺ channel. *EMBO J*, 15(24), 6854-6862.
- Friedrich, C., Rinné, S., Zumhagen, S., Kiper, A. K., Silbernagel, N., Netter, M. F., et al. (2014). Gain-of-function mutation in TASK-4 channels and severe cardiac conduction disorder. *EMBO Mol Med*, 6(7), 937-951.
- Girard, C., Duprat, F., Terrenoire, C., Tinel, N., Fosset, M., Romey, G., et al. (2001). Genomic and functional characteristics of novel human pancreatic 2P domain K⁽⁺⁾ channels. *Biochem Biophys Res Commun*, 282(1), 249-256.
- Goldman, D. E. (1943). POTENTIAL, IMPEDANCE, AND RECTIFICATION IN MEMBRANES. *J Gen Physiol*, 27(1), 37-60.
- Goldstein, M., Rinné, S., Kiper, A. K., Ramírez, D., Netter, M. F., Bustos, D., et al. (2016). Functional mutagenesis screens reveal the 'cap structure' formation in disulfide-bridge free TASK channels. *Sci Rep*, 6, 19492.
- Goldstein, S. A., Bayliss, D. A., Kim, D., Lesage, F., Plant, L. D., & Rajan, S. (2005). International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels. *Pharmacol Rev*, 57(4), 527-540.
- Goldstein, S. A., Bockenhauer, D., O'Kelly, I., & Zilberberg, N. (2001). Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. *Nat Rev Neurosci*, 2(3), 175-184.
- Goldstein, S. A., Price, L. A., Rosenthal, D. N., & Pausch, M. H. (1996). ORK1, a potassium-selective leak channel with two pore domains cloned from *Drosophila melanogaster* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(23), 13256-13261.
- Goldstein, S. A., Wang, K. W., Ilan, N., & Pausch, M. H. (1998). Sequence and function of the two P domain potassium channels: implications of an emerging superfamily. *J Mol Med (Berl)*, 76(1), 13-20.
- González, W., Zúñiga, L., Cid, L. P., Arévalo, B., Niemeyer, M. I., & Sepúlveda, F. V. (2013). An extracellular ion pathway plays a central role in the cooperative gating of a K(2P) K⁺ channel by extracellular pH. *J Biol Chem*, 288(8), 5984-5991.

- Gotter, A. L., Santarelli, V. P., Doran, S. M., Tannenbaum, P. L., Kraus, R. L., Rosahl, T. W., et al. (2011). TASK-3 as a potential antidepressant target. *Brain Res*, 1416, 69-79.
- Gruss, M., Bushell, T. J., Bright, D. P., Lieb, W. R., Mathie, A., & Franks, N. P. (2004). Two-pore-domain K⁺ channels are a novel target for the anesthetic gases xenon, nitrous oxide, and cyclopropane. *Mol Pharmacol*, 65(2), 443-452.
- Guagliardo, N. A., Yao, J., Hu, C., Schertz, E. M., Tyson, D. A., Carey, R. M., et al. (2012). TASK-3 channel deletion in mice recapitulates low-renin essential hypertension. *Hypertension*, 59(5), 999-1005.
- Guo, W., Tian, Y., & Jiang, L. (2013). Asymmetric ion transport through ion-channel-mimetic solid-state nanopores. *Acc Chem Res*, 46(12), 2834-2846.
- Heurteaux, C., Guy, N., Laigle, C., Blondeau, N., Duprat, F., Mazzuca, M., et al. (2004). TREK-1, a K⁺ channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *EMBO J*, 23(13), 2684-2695.
- Hodgkin, A. L., & Katz, B. (1949). The effect of sodium ions on the electrical activity of giant axon of the squid. *J Physiol*, 108(1), 37-77.
- Hoshi, T., Zagotta, W. N., & Aldrich, R. W. (1990). Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science*, 250(4980), 533-538.
- Hummer, G., Rasaiah, J. C., & Noworyta, J. P. (2001). Water conduction through the hydrophobic channel of a carbon nanotube. *Nature*, 414(6860), 188-190.
- Hwang, E. M., Kim, E., Yarishkin, O., Woo, D. H., Han, K. S., Park, N., et al. (2014). A disulphide-linked heterodimer of TWIK-1 and TREK-1 mediates passive conductance in astrocytes. *Nat Commun*, 5, 3227.
- Janin, J. (1979). Surface and inside volumes in globular proteins. *Nature*, 277(5696), 491-492.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B. T., & MacKinnon, R. (2002). The open pore conformation of potassium channels. *Nature*, 417(6888), 523-526.
- Kang, D., & Kim, D. (2004). Single-channel properties and pH sensitivity of two-pore domain K⁺ channels of the TALK family. *Biochem Biophys Res Commun*, 315(4), 836-844.
- Karschin, C., Wischmeyer, E., Preisig-Müller, R., Rajan, S., Derst, C., Grzeschik, K. H., et al. (2001). Expression pattern in brain of TASK-1, TASK-3, and a tandem pore domain K⁽⁺⁾ channel subunit, TASK-5, associated with the central auditory nervous system. *Mol Cell Neurosci*, 18(6), 632-648.
- Ketchum, K. A., Joiner, W. J., Sellers, A. J., Kaczmarek, L. K., & Goldstein, S. A. (1995). A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature*, 376(6542), 690-695.
- Kim, D., Cavanaugh, E. J., Kim, I., & Carroll, J. L. (2009). Heteromeric TASK-1/TASK-3 is the major oxygen-sensitive background K⁺ channel in rat carotid body glomus cells. *J Physiol*, 587(Pt 12), 2963-2975.

- Kim, D., & Gnatenco, C. (2001). TASK-5, a new member of the tandem-pore K⁽⁺⁾ channel family. *Biochem Biophys Res Commun*, 284(4), 923-930.
- Kim, Y., Bang, H., & Kim, D. (2000). TASK-3, a new member of the tandem pore K⁽⁺⁾ channel family. *J Biol Chem*, 275(13), 9340-9347.
- Kiss, L., LoTurco, J., & Korn, S. J. (1999). Contribution of the selectivity filter to inactivation in potassium channels. *Biophys J*, 76(1 Pt 1), 253-263.
- Kruse, M., Schulze-Bahr, E., Corfield, V., Beckmann, A., Stallmeyer, B., Kurtbay, G., et al. (2009). Impaired endocytosis of the ion channel *TRPM4* is associated with human progressive familial heart block type I. *J Clin Invest*, 119(9), 2737-2744.
- Lafrenière R.G., Cader M.Z., Poulin J.F., Andres-Enguix I., Simoneau M., Gupta N., et al. (2010). A dominant-negative mutation in the TRESK potassium channel is linked to familial migraine with aura. *Nat Med* 16:1157–1160
- Lauritzen, I., Zanzouri, M., Honoré, E., Duprat, F., Ehrenguber, M. U., Lazdunski, M., et al. (2003). K⁺-dependent cerebellar granule neuron apoptosis. Role of task leak K⁺ channels. *J Biol Chem*, 278(34), 32068-32076.
- Lengyel, M., Czirják, G., Enyedi, P. (2016). Formation of Functional Heterodimers by TREK-1 and TREK-2 Two-pore Domain Potassium Channel Subunits. *J Biol Chem*, 291(26), 13649-13661.
- Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G., et al. (1996). TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *EMBO J*, 15(5), 1004-1011.
- Lesage, F., & Lazdunski, M. (2000). Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol*, 279(5), F793-801.
- Lesage, F., Reyes, R., Fink, M., Duprat, F., Guillemare, E., & Lazdunski, M. (1996). Dimerization of TWIK-1 K⁺ channel subunits via a disulfide bridge. *EMBO J*, 15(23), 6400-6407.
- Levy, D. I., & Deutsch, C. (1996). Recovery from C-type inactivation is modulated by extracellular potassium. *Biophys J*, 70(2), 798-805.
- Linden, A. M., Aller, M. I., Leppä, E., Vekovischeva, O., Aitta-Aho, T., Veale, E. L., et al. (2006). The in vivo contributions of TASK-1-containing channels to the actions of inhalation anesthetics, the alpha (2) adrenergic sedative dexmedetomidine, and cannabinoid agonists. *J Pharmacol Exp Ther*, 317(2), 615-626.
- Liu, H., El Zein, L., Kruse, M., Guinamard, R., Beckmann, A., Bozio, A., et al. (2010). Gain-of-function mutations in *TRPM4* cause autosomal dominant isolated cardiac conduction disease. *Circ Cardiovasc Genet*, 3(4), 374-385.
- Lopatin, A. N., Makhina, E. N., & Nichols, C. G. (1994). Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature*, 372(6504), 366-369.

- Lopes, C. M., Gallagher, P. G., Buck, M. E., Butler, M. H., & Goldstein, S. A. (2000). Proton block and voltage gating are potassium-dependent in the cardiac leak channel Kcnk3. *J Biol Chem*, 275(22), 16969-16978.
- Lopes, C. M., Rohács, T., Czirják, G., Balla, T., Enyedi, P., & Logothetis, D. E. (2005). PIP2 hydrolysis underlies agonist-induced inhibition and regulates voltage gating of two-pore domain K⁺ channels. *J Physiol*, 564(Pt 1), 117-129.
- Lopes, C. M., Zilberberg, N., & Goldstein, S. A. (2001). Block of *KCNK3* by protons. Evidence that 2-P-domain potassium channel subunits function as homodimers. *J Biol Chem*, 276(27), 24449-24452.
- López-Barneo, J., Hoshi, T., Heinemann, S. H., & Aldrich, R. W. (1993). Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of Shaker potassium channels. *Receptors Channels*, 1(1), 61-71.
- Ma, L., Zhang, X., Zhou, M., & Chen, H. (2012). Acid-sensitive TWIK and TASK two-pore domain potassium channels change ion selectivity and become permeable to sodium in extracellular acidification. *J Biol Chem*, 287(44), 37145-37153.
- Ma L., Roman-Campos D., Austin E.D., Eyries M., Sampson K.S., Soubrier F., et al. (2013). A novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 369:351–361.
- Maingret, F., Honoré, E., Lazdunski, M., & Patel, A. J. (2002). Molecular basis of the voltage-dependent gating of TREK-1, a mechano-sensitive K⁽⁺⁾ channel. *Biochem Biophys Res Commun*, 292(2), 339-346.
- Miller, A. N., & Long, S. B. (2012). Crystal structure of the human two-pore domain potassium channel K2P1. *Science*, 335(6067), 432-436.
- Morton, M. J., Abohamed, A., Sivaprasadarao, A., & Hunter, M. (2005). pH sensing in the two-pore domain K⁺ channel, TASK2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(44), 16102-16106.
- Niemeyer, M.I., Cid, L.P., González, W., & Sepúlveda, F.V. (2016) Gating, Regulation, and Structure in K2P K⁺ Channels: In Varietate Concordia? *Mol Pharmacol*, 90, 309–317
- Niemeyer, M. I., Cid, L. P., Paulais, M., Teulon, J., & Sepúlveda, F. V. (2017). Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate dynamically regulates the K2P background K⁽⁺⁾ channel TASK-2. *Sci Rep*, 7, 45407.
- Niemeyer, M. I., Cid, L. P., Peña-Münzenmayer, G., & Sepúlveda, F. V. (2010). Separate gating mechanisms mediate the regulation of K2P potassium channel TASK-2 by intra- and extracellular pH. *J Biol Chem*, 285(22), 16467-16475.
- Niemeyer, M. I., Cid, L. P., Valenzuela, X., Paeile, V., & Sepúlveda, F. V. (2003). Extracellular conserved cysteine forms an intersubunit disulphide bridge in the KCNK5 (TASK-2) K⁺ channel without having an essential effect upon activity. *Mol Membr Biol*, 20(2), 185-191.

- Niemeyer, M. I., González-Nilo, F. D., Zúñiga, L., González, W., Cid, L. P., & Sepúlveda, F. V. (2006). Gating of two-pore domain K⁺ channels by extracellular pH. *Biochem Soc Trans*, 34(Pt 5), 899-902.
- Niemeyer, M. I., González-Nilo, F. D., Zúñiga, L., González, W., Cid, L. P., & Sepúlveda, F. V. (2007). Neutralization of a single arginine residue gates open a two-pore domain, alkali-activated K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(2), 666-671.
- Numberger, M., Draguhn A. (1996) Patch-Clamp-Technik. *Spektrum Akademischer Verlag*, 1. Auflage, ISBN-10: 3827400236
- O'Connell, A. D., Morton, M. J., & Hunter, M. (2002). Two-pore domain K⁺ channels-molecular sensors. *Biochim Biophys Acta*, 1566(1-2), 152-161.
- Ogielska, E.M., and Aldrich, R.W. (1999). Functional consequences of a decreased potassium affinity in a potassium channel pore. Ion interactions and C-type inactivation. *J. Gen. Physiol.* 113, 347–358.
- Pang, D. S., Robledo, C. J., Carr, D. R., Gent, T. C., Vyssotski, A. L., Caley, A., et al. (2009). An unexpected role for TASK-3 potassium channels in network oscillations with implications for sleep mechanisms and anesthetic action. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(41), 17546-17551.
- Patel, A. J., Maingret, F., Magnone, V., Fosset, M., Lazdunski, M., & Honoré, E. (2000). TWIK-2, an inactivating 2P domain K⁺ channel. *J Biol Chem*, 275(37), 28722-28730.
- Plant, L. D., Zuniga, L., Araki, D., Marks, J. D., & Goldstein, S. A. (2012). SUMOylation silences heterodimeric TASK potassium channels containing K2P1 subunits in cerebellar granule neurons. *Sci Signal*, 5(251), ra84.
- Probst, V., Kyndt F., Potet F., Trochu J.N., Mialet G., Demolombe S., Schott J.J., Baro I., Escande D., Le Marec H. (2003). Haploinsufficiency in combination with aging causes *SCN5A*-linked hereditary Lenegre disease. *J Am Coll Cardio*, 41: 643 – 652
- Rajan, S., Wischmeyer, E., Karschin, C., Preisig-Müller, R., Grzeschik, K. H., Daut, J., et al. (2001). THIK-1 and THIK-2, a novel subfamily of tandem pore domain K⁺ channels. *J Biol Chem*, 276(10), 7302-7311.
- Rajan, S., Wischmeyer, E., Xin Liu, G., Preisig-Müller, R., Daut, J., Karschin, A., et al. (2000). TASK-3, a novel tandem pore domain acid-sensitive K⁺ channel. An extracellular histiding as pH sensor. *J Biol Chem*, 275(22), 16650-16657.
- Reyes, R., Duprat, F., Lesage, F., Fink, M., Salinas, M., Farman, N., et al. (1998). Cloning and expression of a novel pH-sensitive two pore domain K⁺ channel from human kidney. *J Biol Chem*, 273(47), 30863-30869.
- Rödström, K.E.J., Kiper, A.K., Zhan, W., Rinné, S., Pike, A.C.W., Goldstein, M., et al. (2020). A lower X-gate in TASK channels traps inhibitors within the vestibule. *Nature* 582, 443–447

- Sakmann, B., Neher, E. (1995) Single-Channel Recording. *Plenum Press*. Second Edition. ISBN 0-306-44870-X
- Schewe, M., Nematian-Ardestani, E., Sun, H., Musinszki, M., Cordeiro, S., Bucci, G., et al. (2016). A Non-canonical Voltage-Sensing Mechanism Controls Gating in K2P K⁽⁺⁾ Channels. *Cell*, 164(5), 937-949.
- Schott, J. J., Alshinawi, C., Kyndt, F., Probst, V., Hoorntje, T. M., Hulsbeek, M., et al. (1999). Cardiac conduction defects associate with mutations in *SCN5A*. *Nat Genet*, 23(1), 20-21
- Stallmeyer, B., Zumhagen, S., Denjoy, I., Duthoit, G., Hébert, J. L., Ferrer, X., et al. (2012). Mutational spectrum in the Ca (2+)-activated cation channel gene *TRPM4* in patients with cardiac conductance disturbances. *Hum Mutat*, 33(1), 109-117.
- Stansfeld, P. J., Grottesi, A., Sands, Z. A., Sansom, M. S., Gedeck, P., Gosling, M., et al. (2008). Insight into the mechanism of inactivation and pH sensitivity in potassium channels from molecular dynamics simulations. *Biochemistry*, 47(28), 7414-7422.
- Vergani, P., Hamilton, D., Jarvis, S., & Blatt, M. R. (1998). Mutations in the pore regions of the yeast K⁺ channel *YKC1* affect gating by extracellular K⁺. *EMBO J*, 17(24), 7190-7198.
- Villmann, C., H., Bull, L., Hollmann, M. (1997). Kainate Binding Proteins Possess Functional Ion Channel Domains. *The Journal of Neuroscience*, 17(20), 7634-7643
- Watanabe, H., Koopmann, T. T., Le Scouarnec, S., Yang, T., Ingram, C. R., Schott, J. J., et al. (2008). Sodium channel $\beta 1$ subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. *J Clin Invest*, 118(6), 2260-2268.
- Woo, D. H., Han, K. S., Shim, J. W., Yoon, B. E., Kim, E., Bae, J. Y., et al. (2012). TREK-1 and Best1 channels mediate fast and slow glutamate release in astrocytes upon GPCR activation. *Cell*, 151(1), 25-40.
- Yuill, K. H., Stansfeld, P. J., Ashmole, I., Sutcliffe, M. J., & Stanfield, P. R. (2007). The selectivity, voltage-dependence and acid sensitivity of the tandem pore potassium channel TASK-1: contributions of the pore domains. *Pflugers Arch*, 455(2), 333-348.
- Zerangue N, Schwappach B, Jan YN, Jan LY (1999) A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K_{ATP} channels. *Neuron* 22: 537 – 548
- Zhou, M., & MacKinnon, R. (2004). A mutant KcsA K⁽⁺⁾ channel with altered conduction properties and selectivity filter ion distribution. *J Mol Biol*, 338(4), 839-846.
- Zilberberg, N., Ilan, N., & Goldstein, S. A. (2001). KCNKØ: opening and closing the 2-P-domain potassium leak channel entails "C-type" gating of the outer pore. *Neuron*, 32(4), 635-648.

8. ANHANG

8.1. Publikationen

The `cap` structure provides an essential structural requirement for the stabilization of the K^+ -flux gated open state of K_{2P} channels

Vowinkel, K.S.¹, Rinné, S.¹, Kopec, W.², **Leonhardt, J.**¹, Bedoya, M.³, Schewe, M.⁴, Kiper, A.K.¹, Baukrowitz, T.⁴, González, W.³, de Groot, B.L.² and Decher, N.¹ (2019) Posterpräsentation mit Auszeichnung durch einen Posterpreis, 98th Meeting, Deutsche Physiologische Gesellschaft.

8.2. Verzeichnis der akademischen Lehrer/-innen

Meine akademischen Lehrerinnen und Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren in alphabetischer Reihenfolge die Damen und Herren:

Adamkiewicz, Baranowski, Bartsch, Baum, Becker, Bergmann, Best, Braun, Cetin, Czubayko, Daut, Decher, Dodel, Donner-Banzhoff, Feuser, Fritz, Gress, Grundmann, Hertl, Hildebrandt, Höffken, Hofmann, Kann, Kerwat, Kinscherf, Kircher, Kluge, König, Kruse, Lill, Lohoff, Mahnken, Maier, Moll, Moosdorf, Müller-Brüsselbach, Mutters, Neumüller, Nimphius, Oberwinkler, Oertel, Opitz, Pagenstecher, Plant, Preisig-Müller, Reese, Renz, Richter, Riße, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Schneider, Schratt, Seitz, Sekundo, Sevinc, Steininger, Timmermann, Timmesfeld, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wrocklage, Wulf, Vogt.

8.3. Danksagung

Vorrangig möchte ich mich bei Prof. Dr. Niels Decher bedanken, der mir ermöglichte, in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren. Für die Unterstützung während der Laborarbeit in Marburg, die vielen Ratschläge bei den elektrophysiologischen Experimenten und motivierenden Worte in den entsprechenden Momenten, bin ich sehr dankbar. Außerdem danke ich ihm für die Begutachtung dieser Arbeit.

Großer Dank gilt PD Dr. Susanne Rinné, die mich als Betreuerin dieses Projektes immer unterstützte. Darüber hinaus hat sie diese Arbeit sorgfältig gelesen und korrigiert. Dieser reibungslose Ablauf hat das Schreiben sehr viel erträglicher gemacht und dabei geholfen, den roten Faden niemals zu verlieren.

Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank den Kollegen des elektrophysiologischen Instituts: Dr. Nicole Silbernagel und Dr. Beatriz Ortiz-Bonin für das geduldige TEVC-Training und die mir darüber hinaus einen so freundschaftlichen und herzlichen Einstieg in die Arbeitsgruppe ermöglicht haben. Außerdem Dr. Lina Matschke, die mich in die Laborarbeit eingeführt hat und immer als kompetente Ansprechpartnerin zur Stelle war. Dr. Aytug Kiper als wichtigste Stütze während der Patch-Clamp-Phase, der immer den Blick für das Wesentliche behielt und mit seiner Ruhe und Erfahrung entscheidend zum Gelingen dieser Experimente beigetragen hat. Zudem möchte ich mich bei ihm für die vielen stoisch ertragenen überflüssigen Fußwege zwischen seinem Büro und dem Patch-Clamp-Setup bedanken, über die er sich nie beschwert hat. Kirsty Vowinkel für die sorgfältige Analyse der Einzelkanal-Messungen und für ihre Hilfsbereitschaft in allen Fragen rund um dieses komplexe Thema. Dank gilt zudem den medizinisch-technischen Assistentinnen Oxana Nowak und Andrea Schubert, die in molekularbiologischen Fragen und auch darüber hinaus immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Günter Schlichthörl danke ich für die technische Unterstützung, Kersten Schneider aus der feinmechanischen Werkstatt für die umgehende Versorgung kleiner Notfälle am Messstand.

Abschließend möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die mich in der langen Phase dieser Promotion immer bedingungslos unterstützt und viel Verständnis entgegengebracht haben. Im Besonderen meiner Mutter, ohne die ich diesen Punkt im Leben vermutlich nie erreicht hätte. Danke für Alles!